



**You have downloaded a document from  
RE-BUS  
repository of the University of Silesia in Katowice**

**Title:** Rola bakterii endofitycznych w fitoremediacji gleb skażonych związkami ropopochodnymi

**Author:** Małgorzata Pawlik

**Citation style:** Pawlik, Małgorzata. (2018). Rola bakterii endofitycznych w fitoremediacji gleb skażonych związkami ropopochodnymi. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIwersYTET ŚLĄSKI  
W KATOWICACH



Biblioteka  
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki  
i Szkolnictwa Wyższego



Wydział Biologii i Ochrony Środowiska  
Uniwersytet Śląski w Katowicach

**MAŁGORZATA PAWLIK**

**PRACA DOKTORSKA**

**Rola bakterii endofitycznych w fitoremediacji gleb skażonych  
związkami ropopochodnymi**

Praca doktorska wykonana  
w Katedrze Mikrobiologii  
Uniwersytetu Śląskiego w Katowicach

Promotor:  
Prof. dr hab. Zofia Piotrowska-Seget

Katowice 2018

Badania finansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach grantu PRELUDIUM  
2013/09/N/NZ9/01606

Pracę wykonywano przy wsparciu stypendialnym w ramach projektu UPGOW – Uniwersytet  
Partnerem Gospodarki Opartej na Wiedzy oraz *DoktoRIS – Programu stypendialnego na  
rzecz innowacyjnego Śląska* współfinansowanego przez Unię Europejską w ramach  
Europejskiego Funduszu Społecznego

## ***Serdeczne podziękowania składam:***

***Pani prof. dr hab. Zofii Piotrowskiej-Seget***, Promotorowi niniejszej pracy za zainteresowanie przedmiotem badań, przekazaną wiedzę, motywację do pracy, wyrozumiałość i cierpliwość.

***Panu prof. dr Jaco Vangronsveld*** za możliwość odbycia stażu w Hasselt University, Centre for Environmental Sciences (CMK).

***Dr Sofie Thijs*** za wyjaśnienie wielu kwestii związanych z bakteriami endofitycznymi oraz wprowadzenie w tajniki pirosekwencjonowania.

***Dr Ariadnie Sánchez-López*** oraz ***Dr Evdokii Syranidou*** za pomoc w laboratorium, dyskusje naukowe oraz inspirującą atmosferę pracy.

***Dr Magdalenie Pacwie-Płociniczak*** za dyskusje nie tylko naukowe, wsparcie, dzięki któremu łapałam oddech i precyzowałam cele badawcze, inspirację, pomoc w analizach, oraz wiarę w realizację zadań, która stawiała na nogi.

***Dr Tomaszowi Płociniczak*** za pomoc w analizie chromatograficznej oraz dzielenie się swoim doświadczeniem, przede wszystkim za życzliwość, bezinteresowne wsparcie i możliwość polegania w każdej sytuacji.

***Dr Magdalenie Noszczyńskiej*** oraz ***Dr Kindze Bondarczuk*** za ciepłe słowo, niezliczone rozmowy i życzliwość, która motywowała mnie do pracy.

***Dr Sławomirowi Sułowiczowi*** za pomoc w analizie statystycznej.

***Pracownikom i Doktorantom Katedry Mikrobiologii Uniwersytetu Śląskiego*** za wspaniałą atmosferę w pracy.

***Rodzinie i Mężowi Mateuszowi*** za każdy dzień zrozumienia, wsparcia, mobilizację do pracy i wiarę w to, że dzięki pracy mogę osiągnąć zamierzony cel.

*Pracę dedykuję mojej Rodzinie*

## Spis treści

Wykaz skrótów .....	8
I. PRZEGLĄD LITERATURY .....	10
1.1. Związki ropopochodne .....	10
1.2. Bioremediacja .....	13
1.3. Fitoremediacja .....	15
1.4. Bakterie endofityczne .....	18
1.4.1. Charakterystyka bakterii endofitycznych .....	20
1.4.2. Cechy warunkujące kolonizację gospodarza .....	22
1.4.3. Proces kolonizacji .....	26
1.5. Endofity promujące wzrost roślin .....	29
1.6. Fitoremediacja wspomagana przez bakterie endofityczne .....	32
II. CEL PRACY .....	36
III. MATERIAŁY I METODY .....	37
3.1. Materiały .....	37
3.1.1. Materiał roślinny .....	37
3.1.2. Podłoża i odczynniki chemiczne .....	38
3.2. Metody .....	39
3.2.1. Izolacja bakterii endofitycznych zdolnych do rozkładu surowej ropy naftowej .....	39
3.2.2. Wykorzystanie węglowodorów jako jedyne źródła węgla i energii .....	39
3.2.3. Charakterystyka genotypowych cech bakterii endofitycznych .....	40
3.2.3.1. Określenie przynależności gatunkowej wyizolowanych szczepów .....	40
3.2.3.2. Detekcja genów kodujących enzymy zaangażowane w rozkład węglowodorów .....	41
3.2.3.3. Detekcja genu <i>acdS</i> .....	42
3.2.3.4. Analiza elektroforetyczna .....	43
3.2.4. Biochemiczna charakterystyka bakterii endofitycznych .....	43
3.2.4.1. Rozpuszczanie fosforanów .....	43
3.2.4.2. Wytwarzanie kwasu indolilo-3-octowego (IAA) .....	43
3.2.4.3. Wytwarzanie cyjanowodoru (HCN) .....	44
3.2.4.4. Produkcja sideroforów .....	44
3.2.4.5. Hamowanie wzrostu fitopatogennych grzybów .....	44
3.2.4.6. Produkcja enzymów celulolitycznych .....	45
3.2.4.7. Zdolność do ruchu .....	45
3.2.4.8. Biosynteza biosurfaktantów/bioemulsyfikatorów .....	45

3.2.5. Pirosekwencjonowanie 454 .....	46
3.2.5.1. Izolacja DNA z roślin .....	46
3.2.5.2. PCR.....	46
3.2.5.3. Analiza wyników pirosekwencjonowania 454 .....	47
3.2.6. Doświadczenie fitoremediacyjne.....	48
3.2.6.1. Gleba.....	48
3.2.6.2. Szczepy bakterii endofitycznych .....	49
3.2.6.3. Inokulum.....	49
3.2.6.4. Doświadczenie fitoremediacyjne .....	50
3.2.6.5. Oznaczenie zawartości TPH w glebie.....	51
3.2.6.6. Ocena przeżywalności wprowadzonych bakterii endofitycznych .....	51
3.2.6.7. Badanie wpływu introdukowanych szczepów bakterii na przyrost biomasy roślin ..	52
3.2.6.8. Określenie wpływu wprowadzonych szczepów na ogólną liczebność i liczebność bakterii zdolnych do rozkładu węglowodorów alifatycznych w glebie.....	52
3.2.7. Analiza statystyczna .....	53
IV. WYNIKI.....	54
4.1. Izolacja bakterii endofitycznych zdolnych do wykorzystania surowej ropy naftowej.....	54
4.2. Określenie przynależności gatunkowej izolatów .....	55
4.3. Ocena wykorzystania węglowodorów jako jedyne go źródła węgla i energii przez bakterie endofityczne .....	59
4.4. Detekcja genów kodujących enzymy zaangażowane w rozkład węglowodorów .....	60
4.5. Detekcja genu <i>acdS</i> .....	61
4.6. Biochemiczna charakterystyka bakterii endofitycznych .....	62
4.6.1. Mechanizmy promujące wzrost roślin.....	62
4.6.2. Produkcja enzymów celulolitycznych .....	66
4.6.3. Zdolność do ruchu .....	67
4.6.4. Hamowanie wzrostu fitopatogennych grzybów .....	67
4.6.5. Biosynteza biosurfaktantów/bioemulsyfikatorów .....	68
4.7. Bioróżnorodność zespołów bakterii endofitycznych.....	69
4.8. Doświadczenie fitoremediacyjne.....	82
4.8.1. Oznaczenie zawartości TPH w glebie .....	82
4.8.2. Ocena przeżywalności wprowadzonych bakterii endofitycznych.....	83
4.8.3. Wpływ introdukowanych szczepów bakterii na biomasę roślin.....	85
4.8.4. Określenie wpływu wprowadzonych szczepów na ogólną liczebność i liczebność bakterii zdolnych do rozkładu węglowodorów alifatycznych w glebie.....	86

V. DYSKUSJA.....	89
5.1. Bioróżnorodność zespołów bakterii endofitycznych frakcji hodowalnej i niehodowalnej roślin narażonych na wysokie stężenie związków ropopochodnych w glebie .....	89
5.2. Wykorzystanie węglowodorów przez bakterie endofityczne i obecność genów kodujących enzymy zaangażowane w rozkład węglowodorów u badanych izolatów .....	94
5.3. Charakterystyka wyizolowanych bakterii endofitycznych.....	95
5.4. Wpływ bakterii endofitycznych na efektywność usuwania TPH z gleby oraz wzrost roślin w procesie fitoremediacji .....	98
5.5. Przeżywalność bakterii endofitycznych wprowadzanych do gleby i ich zdolność do kolonizacji tkanek roślinnych.....	100
5.6. Wpływ introdukowanych szczepów bakterii endofitycznych na bakterie autochtoniczne gleby .....	101
VI. WNIOSKI .....	102
VII. STRESZCZENIE .....	103
VIII. SUMMARY .....	105
IX. LITERATURA.....	107



## Wykaz skrótów

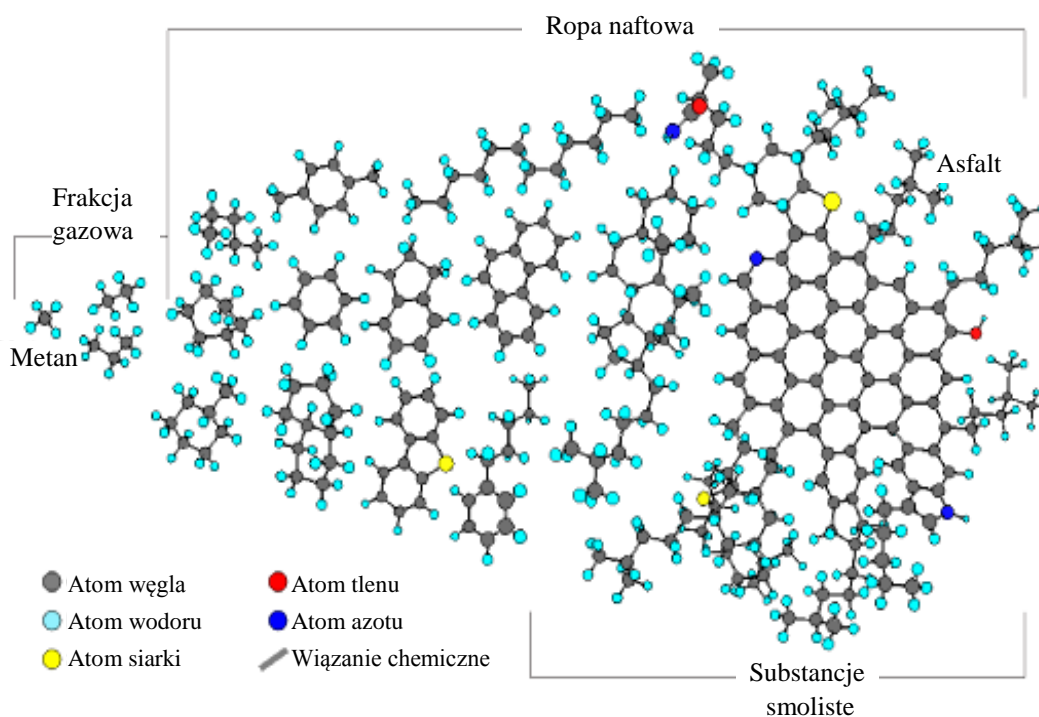
ACC	1-aminocyclopropane-1-carboxylate acid, kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowy
AHL	N-acylated L-homoserine lactone, lakton N-acylo-L-homoseryny
ANOVA	analysis of variance, analiza wariancji
ARDRA	amplified ribosomal DNA restriction analysis, analiza restrykcyjna zamplifikowanych fragmentów rybosomalnego DNA
BLAST	basic local alignment search tool, algorytm służący do porównywania sekwencji aminokwasów białek lub nukleotydów DNA z tymi zawartymi w bazach danych
BTEX	benzene, toluene, ethylbenzene, xylene, benzen, toluen, etylobenzen, ksylen
CAS	Chrome Azurol S, barwnik
CK	cytokininy
CMC	carboxymethylcellulose agar, podłoże z karboksymetylocelulozą
C-TAB	hexadecyltrimethylammonium bromide, bromek haksadecylotrimetyloamoniowy
CWDE	cell wall degrading enzymes, enzymy degradujące ścianę komórkową
D	indeks Simpsona
DDT	dichlorodifenylotrichloroetan
DNA	deoxyribonucleic acid, kwas deoksyrybonukleinowy
dNTP	trifosforany deoksyrybonukleotydów
EPA	Environmental Protection Agency, Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska
EPS	egzopolisacharyd
GA	gibereliny
H'	indeks Shanonna
HCN	cyjanowodór
IAA	kwas indolilo-3-octowy, auksyna
IAM	indole-3-acetamide, indolilo-3-acetamid
IPyA	indole-3-pyruvate, kwas indolilo-3-pirogronowy
ISR	induced systemic resistance, indukowana odporność systemiczna
j.t.k.	jednostki tworzące kolonie
LB	Luria Bertani, podłoże Luria Bertani

log $K_{ow}$	logarytm współczynnika podziału n-oktanol/woda
LPS	lipopolisacharyd
LZO	lotne związki organiczne
MID	sekwencja identyfikująca
MOMP	major outer membrane protein, główne białko zewnątrz błonowe
MW	metabolity wtórne
NCBI	national center for biotechnology information database, bioinformatyczna baza danych
Nod	nodulation factors, czynniki wpływające na powstawanie brodawek korzeniowych
NRE	non-rhizobial endophytes, nierizobiowe bakterie endofityczne
OD	optical density, gęstość optyczna
OTU	operational taxonomic units, operacyjne jednostki taksonomiczne
PCoA	principal coordinate analysis, analiza głównych współrzędnych
PCR	polymerase chain reaction, reakcja łańcuchowa polimerazy
PDA	Potato Dextrose Agar, podłoże
PGPE	plant growth-promoting endophytes, endofity promujące wzrost roślin
pZ	par zasad
QIIME	quantitative insights into microbial ecology
qPCR	quantitative polymerase chain reaction, reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR)
QS	Quorum Sensing
ROS	reactive oxygen species, reaktywne formy tlenu
s.m.	sucha masa
ś.m.	świeża masa
SAR	systemic acquired resistance, nabyta odporność systemiczna
SD	standard deviation, odchylenie standardowe
sid	siderofory
TISS-TVISS	six different secretion systems I-VI, bakteryjne systemy sekrecji I-VI
TPH	total petroleum hydrocarbons, indeks oleju mineralnego
TR	regulatory transkrypcji
TSA	Tryptic Soy Agar, podłoże
VBNC	viable but non-culturable, żywe lecz niehodowalne mikroorganizmy
WWA	wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne

## I. Przegląd literatury

### 1.1. Związki ropopochodne

Ropa naftowa jest złożoną mieszaniną wielu związków chemicznych powstałych w przebiegu skomplikowanych reakcji biochemicznych, chemicznych oraz geochemicznych (Saleem, 2016; Logeshwaran i wsp., 2018). Wśród tych składowych, wyróżniamy nasycone lub nienasycone węglowodory alifatyczne, jedno- i wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, związki heterocykliczne zawierające jeden lub kilka atomów tlenu, azotu lub siarki (tiofeny, pirydyna, pirole, benzofurany, fenole) oraz śladowe ilości jonów metali ciężkich, takich jak: ołów, cyna, arsen, rtęć, german, antymon, tal, wanad, żelazo (Rys. 1) (Thapa i wsp., 2012; Logeshwaran i wsp., 2018).



Rys. 1. Przykładowe substancje ropopochodne występujące w surowej ropie naftowej ([https://energy.usgs.gov/GeochemistryGeophysics/Geochemistry Research/Organic Origins of Petroleum.aspx](https://energy.usgs.gov/GeochemistryGeophysics/Geochemistry%20Research/Organic%20Origins%20of%20Petroleum.aspx)).

Węglowodory alifatyczne, zawierające od trzech do jedenastu atomów węgla w cząsteczce, są najbardziej reaktywne, a w wysokich stężeniach mają działanie toksyczne (Nyyssonen, 2009; Logeshwaran i wsp., 2018). Związki lotne lub szybko parujące jak np. benzen, toluen, etylobenzen, ksylen i ich alkilowe pochodne (BTEX, ang. benzene, toluene, ethylbenzene, xylene), ulatniają się do atmosfery. BTEX oraz wielopierścieniowe

węglowodory aromatyczne (WWA) to najbardziej uciążliwe i zarazem niebezpieczne dla środowiska i organizmów żywych składniki produktów naftowych (Chambers i wsp., 2018). Wynika to między innymi z ich oporności na degradację oraz akumulację w ekosystemach lądowych i wodnych (Maliszewska-Kordybach i wsp., 2008).

W wyniku wydobywania, transportu, składowania i przeróbki ropy naftowej, dochodzi do skażenia wielu terenów, a zanieczyszczenie gruntów i wód związkami ropopochodnymi stanowi poważny ogólnoswiatowy problem (Khan i wsp., 2013, 2017; Farag i wsp., 2018; Logeshwaran i wsp., 2018). Znaczący wzrost zużycia ropy naftowej nastąpił po zakończeniu II Wojny Światowej w krajach szybko rozwijających się. W Polsce w ciągu ostatnich 50 lat zmniejszyło się zużycie węgla kamiennego na rzecz szerokiego wykorzystania ropy naftowej i gazu ziemnego (Bocheński i Bocheńska, 2008). Badania Maliszewskiej-Kordybach i wsp. (2008) wykazały, że w Polsce występują miejsca, gdzie poziom skażenia węglowodorami, zwłaszcza WWA, jest wysoki i przekracza dopuszczalne stężenia tych związków zawarte w Rozporządzeniu Ministra Środowiska z dnia 9 września 2002 r. w sprawie standardów jakości gleby oraz standardów jakości ziemi (Dziennik Ustaw nr 165, poz. 1359).

Obecność związków ropopochodnych w środowisku niesie ze sobą realne zagrożenie dla wszystkich organizmów żywych (Saleem, 2016; Logeshwaran i wsp., 2018). Związki te mogą dostawać się do organizmu wraz z wdychanym powietrzem, gdyż często występują w stanie gazowym lub adsorbują się na cząstkach aerozolu (Chambers i wsp., 2018). Ze względu na dobrą rozpuszczalność węglowodorów w lipidach, ulegają one łatwej akumulacji w żywych organizmach, co skutkuje biomagnifikacją tych substancji na kolejnych poziomach łańcucha troficznego (Mueller i Shann, 2006; Zhang i wsp., 2010). Dlatego też, największa ilość związków ropopochodnych dostaje się do organizmu ludzi i zwierząt wraz z pożywieniem (Kubiak, 2013). Podczas wielu procesów biotransformacji węglowodorów (np. w wątrobie), powstają reaktywne metabolity mające silne powinowactwo do białek, aminokwasów oraz kwasów nukleinowych (Franco i wsp., 2008). Metabolity te już w niewielkich stężeniach wykazują działanie toksyczne, mutagenne i kancerogenne (Maliszewska-Kordybach i wsp., 2008; Nyysönen, 2009).

Substancje ropopochodne trafiając do środowiska wywołują w nim liczne zmiany natury fizycznej, chemicznej i biologicznej (Nyysönen, 2009; Khan i wsp., 2017; Logeshwaran i wsp., 2018). Zdecydowana większość tych substancji pochodzi ze źródeł antropogenicznych, a około 90% z nich ostatecznie akumuluje się w glebie (Gocht i wsp., 2007; Lang i wsp., 2016). Szczególnie wysokie stężenia węglowodory osiągają

w powierzchniowych warstwach gleby, co związane jest z ich niską rozpuszczalnością w wodzie oraz dużym powinowactwem do materii organicznej (Maliszewska-Kordybach i wsp., 2008; Logeshwaran i wsp., 2018). W wyniku sorpcji/desorpcji czy sekwestracji dochodzi do gromadzenia się związków ropopochodnych na granicy niemieszających się faz: ciekłej (roztwór glebowy), stałej (materia organiczna) i gazowej (powietrze glebowe). Węglowodory mogą być adsorbowane na mineralnych lub organicznych cząstkach gleby, w efekcie czego powstają kompleksy o różnej sile i trwałości wiązania. W konsekwencji, ich biodostępność zostaje znacząco ograniczona, a rozkład staje się utrudniony i spowolniony (Kołwzan, 2008; Ukalska-Jaruga i wsp., 2015). Zatykanie porów glebowych przez związki ropopochodne powoduje zmniejszenie pojemności wodnej gleby, a także zakłóca wymianę powietrza. Wraz z akumulacją węglowodorów, zmienia się pH gleby, powstaje deficyt dostępnych form azotu i fosforu, zwiększa się zawartość węgla organicznego w środowisku (Kołwzan, 2008; Lang i wsp., 2016). Zanieczyszczenia te mogą być wymywane w głąb profilu gleby i/lub pod wpływem sił grawitacji przedostawać się do wód gruntowych. W rezultacie tych wszystkich zmian równowaga biologiczna w środowisku narażonym na węglowodory zostaje zakłócona (Logeshwaran i wsp., 2018).

Zanieczyszczenie gleby przez substancje ropopochodne powoduje daleko idące zmiany widoczne także u roślin (Rusin i wsp., 2015). Problem ten wydaje się być szczególnie ważny w sytuacji stałego narażenia roślin na kontakt z tymi związkami. Wyniki analiz materiału roślinnego wskazują, że przeważająca część WWA obecnych w tkankach roślin pochodzi z zanieczyszczeń antropogenicznych (Kubiak, 2013; Lang i wsp., 2016). Ze względu na ograniczony lub zahamowany przez węglowodory dostęp wody, soli mineralnych i powietrza do korzeni, rośliny stopniowo obumierają. Bardzo często dochodzi również do zmian zawartości makro- i mikroelementów w organach roślinnych (Ziółkowska i Wyszowski, 2010; Rusin i wsp., 2015), a także niedoboru jonów metali, będących ważnymi składnikami enzymów roślinnych katalizujących wiele przemian (Ujowundu i wsp., 2011; Rusin i wsp., 2015). Ponadto, u wielu roślin występujących na skażonych terenach, obserwowano deformację korzeni oraz liści i/lub kwiatów. Rośliny te charakteryzowała także zaburzona organogeneza i zmniejszona zawartość chlorofilu (Paskova i wsp., 2006; Rusin i wsp., 2015). W roślinnych częściach nadziemnych może dochodzić do zwiększonej akumulacji związków ropopochodnych z powietrza, ze względu na ich powinowactwo do lipidów, które między innymi występują w kutykuli liści i igieł (Balasubramaniam, 2015). Zanieczyszczenia te przenikają do głębszych warstw tkanek roślinnych, zakłócając przewodzenie wody w naczyniach i przyczyniając się do obumierania różnych organów

roślinnych (Balasubramaniam, 2015). Co więcej, rośliny w celu związania węglowodorów, a tym samym oddzielenia ich od komórek i tkanek, mogą wytwarzać wiele metabolitów wtórnych (związki cyjanogenne, fenolowe, siarkowe i saponiny), które mogą być toksyczne dla zwierząt i ludzi (Rakowska i wsp., 2012; Kubiak, 2013).

Związki ropopochodne obecne w glebie mogą w sposób bezpośredni oddziaływać również na mikroorganizmy, co wynika z wysokiego ich powinowactwa do błony komórkowej bakterii, jak i błony zewnętrznej u bakterii Gram-ujemnych (Sikkema i wsp., 1995; Certik i wsp., 2003; Murinowa i Dercova, 2014). Węglowodory zmieniają funkcjonalne i strukturalne właściwości tych membran. Nagromadzenie ich cząsteczek w błonie komórkowej prowadzi do utraty jej integralności oraz wzrostu przepuszczalności dla jonów. Konsekwencją tych zmian jest zaburzenie homeostazy, ciśnienia osmotycznego i pH wewnątrz komórki bakteryjnej. Oprócz zmian w warstwie lipidowej, węglowodory bezpośrednio wpływają na białka komórkowe zakotwiczone w błonie. W konsekwencji dochodzi do zmiany konformacji białek błonowych, inhibicji aktywności białek enzymatycznych związanych z błonami oraz pomp protonowych (Sikkema i wsp., 1995; Certik i wsp., 2003; Murinowa i Dercova, 2014).

Mikroorganizmy narażone na węglowodory wykształciły różnorodne mechanizmy oporności na te substancje. Są one związane między innymi z modyfikacją składu lipidowego błony komórkowej, polegającą na zwiększaniu ilości nasyconych kwasów tłuszczowych w błonie i konwersji nienasyconych kwasów z konformacji *cis* do *trans*. Ponadto, wzrasta stopień usieciowania ściany komórkowej oraz hydrofilowość warstwy S i lipopolisacharydu (LPS), a węglowodory mogą być aktywnie transportowane przez pompy poza komórkę bakterii (Sikkema i wsp., 1995; Murinowa i Dercova, 2014).

## 1.2. Bioremediacja

Ze względu na nieodzowną konieczność oczyszczania środowiska z toksycznych substancji, a także potrzebę przywracania równowagi biologicznej, opracowano wiele metod remediacji skażonych terenów (Vangronsveld i wsp., 2009; Thapa i wsp., 2012; Khan i wsp., 2013, 2017). W celu usunięcia związków ropopochodnych stosuje się metody fizyczne, chemiczne i/lub biologiczne (Rakowska i wsp., 2012; Saleem, 2016). Każda z tych technik może zostać przeprowadzona *in situ*, czyli w miejscu występowania skażenia, bądź *ex situ*, w której gleba wymaga przetransportowania do punktu jej oczyszczania (Rakowska i wsp., 2012; Thapa i wsp., 2012). Metody fizykochemiczne są kosztowne, mogą prowadzić

do zmiany struktury gleby, wymagają użycia specjalistycznego sprzętu i/lub substancji chemicznych, często dodatkowo zanieczyszczających glebę (Pawlik i wsp., 2015; Logeshwaran i wsp., 2018). Obiecującą alternatywą tych technologii są biologiczne metody oczyszczania środowiska. Są one znacznie tańsze niż metody fizykochemiczne, nie niszczą struktury gleby, przywracają bioróżnorodność gatunkową, mogą być stosowane na dużym obszarze i są powszechnie akceptowane przez społeczeństwo (Mrozik i wsp., 2003, 2005; Vangronsveld i wsp., 2009).

Techniki bioremediacyjne wykorzystują naturalny potencjał mikroorganizmów do degradacji zanieczyszczeń organicznych. Mikroorganizmy posiadają wykształconą w drodze ewolucji zdolność do rozkładu niemal wszystkich naturalnych związków organicznych występujących w przyrodzie oraz ich syntetycznych pochodnych (Mrozik i wsp., 2003, 2005). Szczepy bakterii i grzybów, zdolne do rozkładu węglowodorów, można wyizolować ze środowisk skażonych i nieskażonych. Jednak w tych ostatnich, udział takich szczepów w całej populacji mikroorganizmów glebowych jest niewielki i stanowi 0,01-1% (Łyszcz i Gałązka, 2016). Pojawienie się związków ropopochodnych, szczególnie w bardzo dużym stężeniu, silnie oddziałuje na strukturę zespołów mikroorganizmów, powodując usuwanie mikroorganizmów wrażliwych, a promując wzrost komórek wykazujących oporność i/lub zdolność rozkładu węglowodorów. Związki te, pomimo swojej toksyczności, są dodatkowym źródłem węgla, co prowadzi do wzrostu liczebności szczepów zdolnych do ich degradacji (Siciliano i wsp., 2001; Tardif i wsp., 2016).

Mikroorganizmy mogą wykorzystywać związki ropopochodne jako jedyne źródło węgla i energii lub rozkładać je na drodze kometabolizmu (Mrozik i wsp., 2003, 2005; Guzik i wsp., 2010; Thapa i wsp., 2012). Jednak, nie wszystkie węglowodory ropopochodne są w takim samym stopniu podatne na biodegradację, która wzrasta w następującej kolejności: alkany cykliczne < małowcząsteczkowe węglowodory aromatyczne < alkany rozgałęzione < *n*-alkany (Lang i wsp., 2016). Szczególnie odporne na rozkład mikrobiologiczny są WWA zbudowane z czterech i większej liczby pierścieni (Gałązka, 2015; Logeshwaran i wsp., 2018).

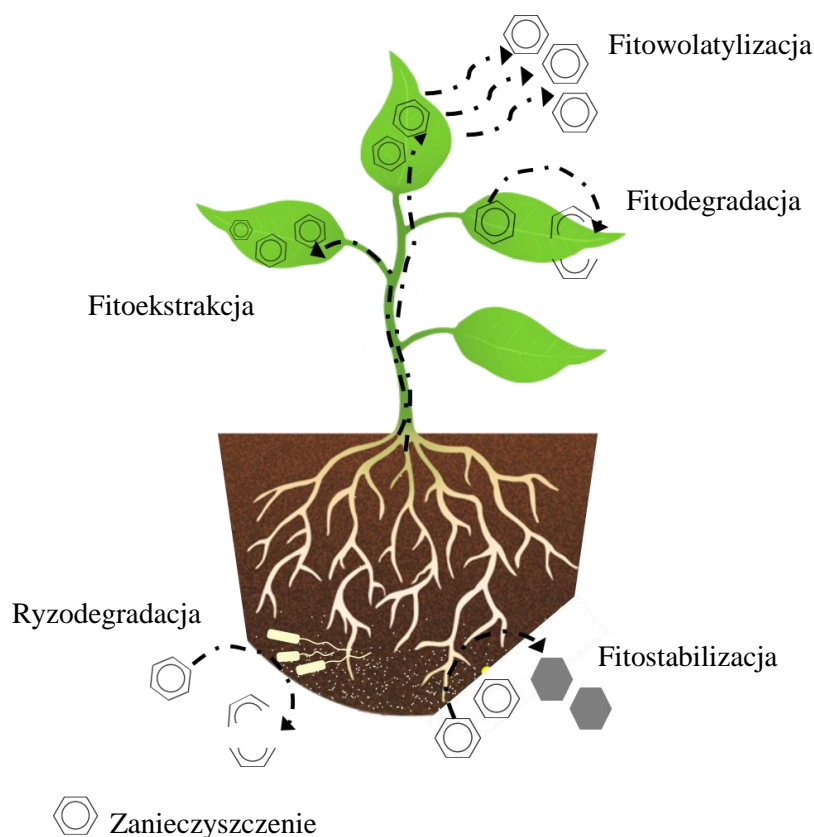
Istotnymi czynnikami wpływającymi na efektywność procesu biodegradacji związków ropopochodnych są: pH gleby, temperatura, której zakres powinien się mieścić w granicach 15-45°C, dostępność pierwiastków biogennych, niezbędnych do wzrostu i rozwoju mikroorganizmów oraz odpowiednia wilgotność związana z rozpuszczalnością substancji ropopochodnych (Weyens i wsp., 2009c; Saleem, 2016). Kolejnym czynnikiem determinującym biodegradację tych substancji jest tlen, gdyż rozkład węglowodorów

zachodzi głównie w warunkach tlenowych. Natomiast stężenie związków ropopochodnych w środowisku, które ma zostać oczyszczone, nie powinno przekraczać biologicznej tolerancji mikroorganizmów na te substancje (Thapa i wsp., 2012; Gałązka, 2015). Do rozkładu związków ropopochodnych zdolne są bakterie zaliczane do rodzajów *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Rhodococcus*, *Sarcina*, *Serratia*, *Sphingomonas*, *Vibrio* oraz *Xanthomonas* (Seo i wsp., 2009; Stolz, 2009; Khan i wsp., 2013; Lang i wsp., 2016). Szczepy te mogą degradować węglowodory ropopochodne wieloetapowymi, nieraz bardzo skomplikowanymi szlakami metabolicznymi. Przykładowo, *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 przekształca piren do intermediatów cyklu Krebsa w ponad dwudziestu etapach katalizowanych przez różne enzymy (Kim i wsp., 2007). Biodegradacja węglowodorów wymaga aktywności, oprócz oksygenaz, także dehydrogenaz i hydrolaz (Guzik i wsp., 2010). Enzymy uczestniczące w metabolizmie węglowodorów zwykle charakteryzuje specyficzność względem grupy podobnych strukturalnie substratów. Przykładowo, dioksygenaza naftalenowa katalizuje rozkład wielu małowymiarowych WWA, a monooksygenaza alkanowa bierze udział w biodegradacji różnych węglowodorów alifatycznych (Nyyssonen, 2009; Guzik i wsp., 2010).

### 1.3. Fitoremediacja

Jedną z biologicznych metod, która skupia na sobie coraz większą uwagę, jest fitoremediacja (Pawlik i wsp., 2015; Ijaz i wsp., 2016; Eskandary i wsp., 2017). Termin fitoremediacja pochodzi od greckiego słowa *phyton* – roślina i łacińskiego *remediare* – oczyszczać. Polega ona na wykorzystaniu naturalnych zdolności roślin i towarzyszących im mikroorganizmów do degradacji szkodliwych substancji występujących na skażonych terenach (Weyens i wsp., 2009a,b,c,d; Ijaz i wsp., 2016; Eskandary i wsp., 2017). Technika ta jest stosowana do usuwania wielu rodzajów zanieczyszczeń, w tym związków ropopochodnych (Khan i wsp., 2013; Pawlik i wsp., 2015). Ze względu na złożoność procesów towarzyszących fitoremediacji, szczególnie sposobu pobierania i eliminacji toksycznych związków przez roślinę (akumulacji, sekwestracji, degradacji, transpiracji), wyróżniono kilka rodzajów fitoremediacji. Zalicza się do nich fitoekstrakcję, fitostabilizację, fitodegradację, fitowolatilizację i ryzodegradację (Rys. 2) (Ijaz i wsp., 2016).





Rys. 2. Rodzaje fitoremediacji.

Szacuje się, że fitoremediacja jest dziesięciokrotnie tańsza od fizykochemicznych metod remediacji gleby, gdyż napędza ją energia słoneczna. Zastąpienie tradycyjnych technik fizykochemicznych, daje oszczędności w wysokości nawet 50-80% (van Epps, 2006). Obliczono, że koszt oczyszczania terenu ze związków ropopochodnych, przy zastosowaniu fitoremediacji, to około 17-100 USD za m<sup>3</sup> gleby, natomiast przy wykorzystaniu technik fizykochemicznych sięga on 10-10 000 USD za m<sup>3</sup> gleby (Frick i wsp., 1999; Dudai i wsp., 2018). Ze względu na fakt, że oczyszczanie gleby za pomocą fitoremediacji wymaga długiego czasu, kilku lub nawet kilkunastu lat, analizując koszty przeprowadzenia tego procesu, należy wziąć pod uwagę perspektywę co najmniej pięciu lat. Wtedy, szczegółowe wyliczenia pokazują, że koszt fitoremediacji danego obszaru to 250 000 USD, podczas gdy zastosowanie metod fizykochemicznych wymaga nakładów około 660 000 USD (Kamath i wsp., 2004; Doty, 2008). Zaletami fitoremediacji są nie tylko niskie koszty, ale także fakt, że rośliny ograniczają rozprzestrzenianie się zanieczyszczeń poza skażony teren, a metoda ta, jako „zielona” alternatywa dla tradycyjnych technik oczyszczania środowiska, cieszy się dużym poparciem społecznym (Eskandary i wsp., 2017).

Niektóre rośliny wykazują ewolucyjnie nabytą zdolność do wzrostu na glebach skażonych związkami ropopochodnymi i tolerują bardzo wysokie stężenia tych związków. Nazywa się je naftofitami. Należy do nich między innymi turzyca (*Carex* sp.), wiechlina łąkowa (*Poa pratensis*), życica trwała (*Lolium perenne*), babka zwyczajna (*Plantago major*), pokrzywa zwyczajna (*Urtica dioica*), które odpowiednio tolerują zanieczyszczenia ropopochodne występujące w glebie w zakresie 204-504 g kg<sup>-1</sup>, 112-320 g kg<sup>-1</sup>, 132-166 g kg<sup>-1</sup>, do 470 g kg<sup>-1</sup>, do 506 g kg<sup>-1</sup> (Małachowska-Jutcz i wsp., 2012). Naftofity mają zdolność do absorpcji, akumulowania i/lub degradacji związków ropopochodnych. Zanieczyszczenia organiczne są pobierane przez rośliny przede wszystkim na zasadzie dyfuzji prostej wraz z wodą. Jednak wiele składników ropy naftowej to związki hydrofobowe, charakteryzujące się wysoką lipofilnością, co uniemożliwia ich swobodne wnikanie do roślin. Dyfuzja tych lipofilowych substancji jest dodatkowo skorelowana z zawartością lipidów w epidermie korzeni. Dodatkowo, rośliny mogą wydzielać związki powierzchniowo czynne, takie jak małowcząsteczkowe kwasy organiczne lub polipeptydy, które obniżają napięcie powierzchniowe i emulgują substancje hydrofobowe zwiększając tym samym ich biodostępność (Wang i wsp., 2016a).

Poza tolerancją na wysokie stężenie związków ropopochodnych w glebie, rośliny stosowane w procesie fitoremediacji, powinny charakteryzować się szybkim wzrostem, rozbudowanym i głęboko sięgającym systemem korzeniowym oraz osiąganiem stosunkowo dużej biomasy. Dlatego ocenia się, że drzewa (topole, wierzby) to jedne z bardziej przydatnych roślin stosowanych w fitoremediacji (Porteous-Moore i wsp., 2006; Doty, 2008). Niemniej jednak, w zależności od typu zanieczyszczenia i rodzaju terenu, z powodzeniem wykorzystuje się także rośliny zielne np. trawy i rośliny strączkowe (Khan i wsp., 2013). Amerykańska Agencja Ochrony Środowiska (EPA, ang. Environmental Protection Agency) poleca stosować przede wszystkim natywne gatunki roślin, czyli takie, które naturalnie występują na obszarze, który chce się poddać fitoremediacji. Taka praktyka zapobiega wprowadzaniu i potencjalnemu rozprzestrzenianiu się obcych gatunków roślin. W Polsce kwestię tę reguluje Ustawa o Ochronie Przyrody z dnia 16 kwietnia 2004 r. (art. 120, ust. 1).

Gatunki roślin, które z powodzeniem wykorzystano w fitoremediacji związków ropopochodnych to m.in.: dziwaczek peruwiański (*Mirabilis jalapa*), lucerna siewna (*Medicago sativa*), życica (*Lolium perenne*, *Lolium multiflorum*), komonica zwyczajna (*Lotus corniculatus*), sorgo dwubarwne (*Sorghum bicolor*), kukurydza zwyczajna (*Zea mays*), trawa bermuszkowa (*Cynodon dactylon*), uczepek zwisły (*Bidens cernua*), gailardia oścista (*Gaillardia aristata*), jeżówka purpurowa (*Echinacea purpurea*), kostrzewa trzcinowa (*Festuca*

*arundinacea*) (Kaimi i wsp., 2006; Shirdam i wsp., 2008; Peng i wsp., 2009; Tang i wsp., 2010; Yousaf i wsp., 2010b; Hall i wsp., 2011; Liu i wsp., 2012).

#### 1.4. Bakterie endofityczne

Termin „endofit” (gr. *endon*–w, wewnątrz; *phyton*–roślina) obejmuje zarówno bakterie, jak i grzyby, kolonizujące zdrowe i żywe tkanki i/lub przestrzenie międzykomórkowe roślin, nie powodując przy tym żadnych objawów chorobowych u swoich gospodarzy (Hardoim i wsp., 2008; Weyens i wsp., 2009b,c,d; Reinhold-Hurek i Hurek, 2011). Jest to unikalna grupa mikroorganizmów, które towarzyszą roślinom i wchodzą z nimi w bardzo ściśle interakcje. W praktyce termin ten odnosi się do mikroorganizmów wyizolowanych z powierzchniowo wysterylizowanych organów roślinnych. Jednak definicja obejmuje także te bakterie, których hodowla w warunkach laboratoryjnych jest ograniczona bądź niemożliwa, a ich obecność w roślinie wykrywana jest za pomocą metod molekularnych (Gaiero i wsp., 2013; Beckers i wsp., 2017).

Większość scharakteryzowanych do tej pory bakterii endofitycznych to gatunki hodowane na standardowych podłożach mikrobiologicznych i opisane w oparciu o analizę cech fenotypowych (Hung i wsp., 2007; Kukla i wsp., 2014b; Pawlik i Piotrowska-Seget, 2015; Pawlik i wsp., 2017). Ze względu na specyficzność zajmowanej niszy ekologicznej, prowadzenie hodowli endofitów w warunkach laboratoryjnych jest bardzo trudne. Powoduje to, że wiedza na temat ilościowego i jakościowego składu zespołów bakterii endofitycznych roślin jest nadal niepełna. Trudność w ocenie rzeczywistej bioróżnorodności endofitów wynika, w dużej mierze, z niemożliwości izolacji i hodowli większości z tych mikroorganizmów klasycznymi metodami hodowlanymi. Bakterie endofityczne mogą występować jako niehodowalne, ale aktywne metabolicznie formy VBNC (viable but non-culturable) (Hurek i wsp., 2002; Gamalero i wsp., 2004, 2005; Compant i wsp., 2010). Przełomem w badaniach nad bioróżnorodnością zespołów mikroorganizmów endofitycznych było zastosowanie technik biologii molekularnej, takich jak: PCR, real-time PCR, elektroforezy w gradiencie czynnika denaturującego, sekwencjonowania oraz zaawansowanych analiz bioinformatycznych. Metody te pozwoliły na poznanie w znaczenie większym zakresie hodowalnej i niehodowalnej frakcji tej grupy mikroorganizmów (Kuklinsky-Sobral i wsp., 2004; Souza i wsp., 2013; Romero i wsp., 2014; Beckers i wsp., 2017).

Większość znanych i opisanych bakterii endofitycznych zaliczanych jest do grup *Alpha-*, *Beta-* oraz *Gammaproteobacteria*, rodzin *Pseudomonaceae*, *Burkholderiaceae* i *Enterobacteriaceae*. Jednak to właśnie *Gammaproteobacteria* jest grupą najbardziej zróżnicowaną i dominującą (Kuklinsky-Sobral i wsp., 2004; Aleklett i wsp., 2015; Truyens i wsp., 2016; Sanchez-Lopez i wsp., 2017). Najczęściej bakterie endofityczne identyfikowane są jako gatunki z rodzajów *Bacillus*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Pantoea*, *Pseudomonas* oraz *Stenotrophomonas* (Seghers i wsp., 2004; Sun i wsp., 2008; Kukla i wsp., 2014b; Thijs i wsp., 2014). Ostatnie badania obejmujące bioróżnorodność mikrobiomu roślinnego koncentrują się nad poznaniem niehodowlanej frakcji bakterii endofitycznych (Souza i wsp., 2013; Romero i wsp., 2014; Shi i wsp., 2014; Beckers i wsp., 2017). Szczegółowa analiza metagenomiczna DNA izolowanego z tkanek ryżu pozwoliła na opisanie bioróżnorodności mikrobiomu tej rośliny. Badania te potwierdziły dominację szczepów należących do *Gammaproteobacteria* i rodzaju *Enterobacter* oraz *Alphaproteobacteria* wraz z rodzajem *Rhizobium* (Sessitsch i wsp., 2012), a także występowanie rzadkich gatunków bakterii należących do *Delta-* oraz *Epsilonproteobacteria* (Sun i wsp., 2008). Analizy metagenomiczne przeprowadzone przez Tsurumaru i wsp. (2015) wykazały, że mikrobiom buraka cukrowego (*Beta vulgaris*) zdominowany jest przez gatunki endofitów należące do *Alpha-*, *Betaproteobacteria* i *Actinobacteria*. Z kolei inne analizy metagenomiczne wykazały, że mikrobiom korzenia i łodygi sorgo (*Sorghum* sp.) znacząco różni się od siebie. Jednak w obu organach dominują bakterie należące do rodzajów takich jak: *Microbacterium*, *Agrobacterium*, *Sphingobacterium*, *Herbaspirillum*, *Erwinia*, *Pseudomonas* oraz *Stenotrophomonas* (Maropola i wsp., 2015).

Analizy sekwencji prokariotycznego DNA wyizolowanego z roślin potwierdziły, że także archeony stanowią istotną składową mikrobiomu niektórych roślin. Organizmy należące do *Archaea* zostały odnalezione w endosferze trzciny pospolitej (*Phragmites australis*), drzewa kawowego (*Coffea arabica*), drzewa oliwnego (*Olea europaea*) oraz buraka cukrowego (*Beta vulgaris*) (Ma i wsp., 2013; Oliveira i wsp., 2013; Muller i wsp., 2015; Shi i wsp., 2015). Wśród endofitów danego gospodarza, archeony mogą stanowić niemałą część całego mikrobiomu, co sugeruje ich znaczącą funkcję w oddziaływaniu z rośliną. W przypadku endosfery drzew oliwnych organizmy należące do *Archaea* (*Thaumarchaeota*, *Crenarchaeota* oraz *Euryarchaeota*) stanowiły, aż 35,8% wszystkich zidentyfikowanych grup mikroorganizmów (Muller i wsp., 2015). Archeony z grupy *Thaumarchaeota* mają zdolność do utleniania amoniaku, a tym samym wpływają na obniżenie pH wewnątrz tkanki roślinnej, co może chronić gospodarza przed

fitopatogenami. Jednak dokładna rola tych organizmów podczas kolonizacji roślin nie została opisana. Z kolei, analizy metagenomiczne mikrobiomu ryżu, nie wykazały obecności żadnej z grup archeonów w endosferze tych roślin (Sessitsch i wsp., 2012).

#### **1.4.1. Charakterystyka bakterii endofitycznych**

Wyróżniamy bakterie endofityczne obligatoryjne, fakultatywne i oportunistyczne (okazjonalne) (Hardoim i wsp., 2008; Reinhold-Hurek i Hurek, 2011). Podział ten związany jest z długością cyklu życiowego bakterii, podczas którego zasiedlają wnętrze roślin (Pisarska i Pietr, 2014). Endofity obligatoryjne to mikroorganizmy ściśle i trwale związane ze swoim gospodarzem. Wykazano, że endofity te utraciły wiele cech umożliwiających im przeżycie poza rośliną (Hardoim i wsp., 2008; Weyens i wsp., 2009c,d; Truyens i wsp., 2015). Bytują one w tkankach roślin przez cały swój cykl życiowy, tworząc podstawowy mikrobiom gospodarza kształtowany już na etapie zawiązywania nasion. Endofity przekazywane są kolejnym pokoleniom za pośrednictwem nasion i/lub wegetatywnego materiału rozmnożeniowego (Pisarska i Pietr, 2014; Truyens i wsp., 2015). Druga grupa, endofity fakultatywne, obejmuje bakterie, które mogą występować i rozwijać się zarówno w roślinie, jak i poza nią, a wnikają do roślinnego gospodarza z otaczającego środowiska. Z kolei endofity okazjonalne to bakterie, które tylko w określonych warunkach występują we wnętrzu tkanek i wykorzystują substancje organiczne pochodzenia roślinnego. Ponadto, chronią się we wnętrzu roślin, gdzie w porównaniu do środowiska glebowego, konkurencja między mikroorganizmami jest mniejsza (Compant i wsp., 2005; Hardoim i wsp., 2008; Weyens i wsp., 2009c,d; Pisarska i Pietr, 2014).

Bakterie endofityczne mogą kolonizować wszystkie organy roślinne: korzenie, łodygi, liście, kwiaty, owoce, nasiona i brodawki korzeniowe. Liczebność oraz różnorodność gatunkowa bakterii endofitycznych jest zmienna wzdłuż osi rośliny (Bulgarelli i wsp., 2012; Gaiero i wsp., 2013). Najbardziej ilościowo i jakościowo zróżnicowany mikrobiom roślin obserwuje się w korzeniach, co wynika z bezpośredniego ich kontaktu z glebą, będącą głównym rezerwuarem endofitów (Thijs i wsp., 2014; Santoyo i wsp., 2016). Wraz ze wzrostem odległości od miejsca kolonizacji, a także mniejszą ilością składników mineralnych dostarczanych przez ksylem, zmniejsza się liczebność i różnorodność bakterii endofitycznych (Gaiero i wsp., 2013; Beckers i wsp., 2017). Organy generatywne zazwyczaj są ich pozbawione.

Liczebność bakterii endofitycznych w korzeniu wynosi średnio  $10^5$ - $10^7$  j.t.k. (jednostek tworzących kolonie)  $g^{-1}$  ś.m. (świeżej masy) korzenia, podczas gdy w łodygach wartości te wahają się w granicach  $10^3$ - $10^4$  j.t.k.  $g^{-1}$  ś.m. łodyg, a w liściach  $10^2$ - $10^3$  j.t.k.  $g^{-1}$  ś.m. liści (Rosenblueth i Martinez-Romero, 2006; Weyens i wsp., 2009d; Compant i wsp., 2010; Mercado-Blanco i Lugtenberg, 2014). Największe różnice w liczebności bakterii endofitycznych obserwuje się w nasionach, w których waha się ona od 55 j.t.k.  $g^{-1}$  u fasoli (Rosenblueth i wsp., 2010), przez  $10^3$ - $10^5$  j.t.k.  $g^{-1}$  u ryżu (Hardoim i wsp., 2012), do nawet  $10^7$  j.t.k.  $g^{-1}$  u rzepaku (Graner i wsp., 2003). Liczebność bakterii endofitycznych zmienia się wraz ze wzrostem, rozwojem i wiekiem rośliny (Wagner i wsp., 2016). W młodych siewkach jest najmniejsza i wzrasta w trakcie rozwoju, aby w roślinach dojrzałych zwiększyć się prawie dwukrotnie (Stępniewska i Kuźniar, 2013).

Wspólnie z bakteriami symbiotycznymi (rizobiami), bakterie endofityczne mogą występować w brodawkach korzeniowych. Nazywane są wtedy nierizobiowymi bakteriami endofitycznymi (NRE, ang. non-rhizobial endophytes) i mogą stanowić nawet do 24% wszystkich mikroorganizmów występujących w brodawkach (De Meyer i wsp., 2015). NRE nie indukują u roślin powstawania brodawek korzeniowych oraz nie posiadają genów *nod* (Palaniappan i wsp., 2010). Są to kluczowe cechy NRE, umożliwiające ich identyfikację i odróżnienie od rizobiów. Wykazano, że wspólna inokulacja NRE i rizobiów zwiększa efektywność tworzenia brodawek korzeniowych oraz promuje wzrost roślin (Rajendran i wsp., 2008; Pandya i wsp., 2015). Ponadto, obecność bakterii endofitycznych NRE w brodawkach korzeniowych ułatwia wiązanie azotu atmosferycznego i przyswajanie go przez roślinę (Subramanian i wsp., 2015).

Proces kolonizacji brodawek korzeniowych przez bakterie endofityczne *Rhizobium* sp. KAW12 zachodzić może tylko w obecności bakterii symbiotycznych *Mesorhizobium loti*, które indukują tworzenie nici infekcyjnych poprzez wydzielanie czynników Nod (ang. nodulation factors). Co więcej, proces ten jest regulowany i kontrolowany przez roślinę poprzez transkrypcję odpowiednich genów (*Cyclops*, *Cerberus*, *Nap1*, *ArpC1*, *Npl1*, *Alb1*) we wczesnej fazie zawiązywania symbiozy. Aktywność u roślin innych genów, takich jak: *Crinkle* oraz *Sst1*, jest niezbędna podczas infekcji i symbiozy bakterii symbiotycznych *M. loti*, natomiast podczas kolonizacji przez bakterie endofityczne, ich aktywności nie wykazano. Sugeruje to, występowanie u roślin specyficznych mechanizmów będących odpowiedzią na obecność bakterii endofitycznych (Zgadza i wsp., 2015).

Przypuszcza się, że każda z blisko 300 000 obecnie znanych roślin jest zasiedlana przez jeden lub wiele gatunków bakteryjnych endofitów (Ryan i wsp., 2008). Różnorodność

endofitów nie jest stała i zależy w dużej mierze od gatunku i wieku rośliny, rodzaju tkanki, sezonu wegetacyjnego, warunków środowiska, typu, rodzaju i właściwości fizykochemicznych gleby (Bulgarelli i wsp., 2012, 2013; Gaiero i wsp., 2013). Nie bez znaczenia pozostają także wszelkie zabiegi rolnicze (nawożenie, stosowanie pestycydów) (Seghers i wsp., 2004) oraz obecność zanieczyszczeń (metale ciężkie, związki ropopochodne) (Khan i wsp., 2013; Ma i wsp., 2016).

Wielu autorów jest zgodnych w kwestii, że to roślina „decyduje” o tym, które mikroorganizmy tworzyć będą jej mikrobiom (Bulgarelli i wsp., 2013; Beckers i wsp., 2017). Niezwykle interesującym jest fakt, że rośliny z terenów zanieczyszczonych posiadają zdolność do przyciągania bakterii endofitycznych degradujących toksyczne związki. Siciliano i wsp. (2001) wykazali, że w korzeniach kostrzewy trzcinowej (*Festuca arundinacea*) liczebność bakterii endofitycznych posiadających geny *alkB* oraz *ndoB*, związanych z rozkładem związków ropopochodnych była odpowiednio dwa i cztery razy większa niż w glebie pozakorzeniowej. W badaniach Lemanceau i wsp. (1995) wykazano, że len zwyczajny (*Linum usitatissimum*) oraz pomidor (*Lycopersicon esculentum*) przyciągały specyficzne szczepy z rodzaju *Pseudomonas*. Natomiast, *Arabidopsis thaliana* wytwarzała atraktanty dla szczepów *Bacillus* spp., które produkowały związki hamujące wzrost fitopatogenów (Kloepper i wsp., 2004). Wprowadzenie na powierzchnię liści *A. thaliana* fitopatogennych bakterii *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 indukowało wydzielanie przez korzenie kwasu jabłkowego, co z kolei wzmagało chemotaksję, tworzenie biofilmu i kolonizację tkanek korzenia przez endofity *B. subtilis* FB17. Zjawisko to nie występowało, gdy *A. thaliana* inokulowano niepatogennymi szczepami *Pseudomonas syringae* NPS3121 (Rudrappa i wsp., 2008). Wyniki tych badań potwierdzają istotny udział roślin w selekcji bakterii endofitycznych, wykazujących pożądane cechy.

#### 1.4.2. Cechy warunkujące kolonizację gospodarza

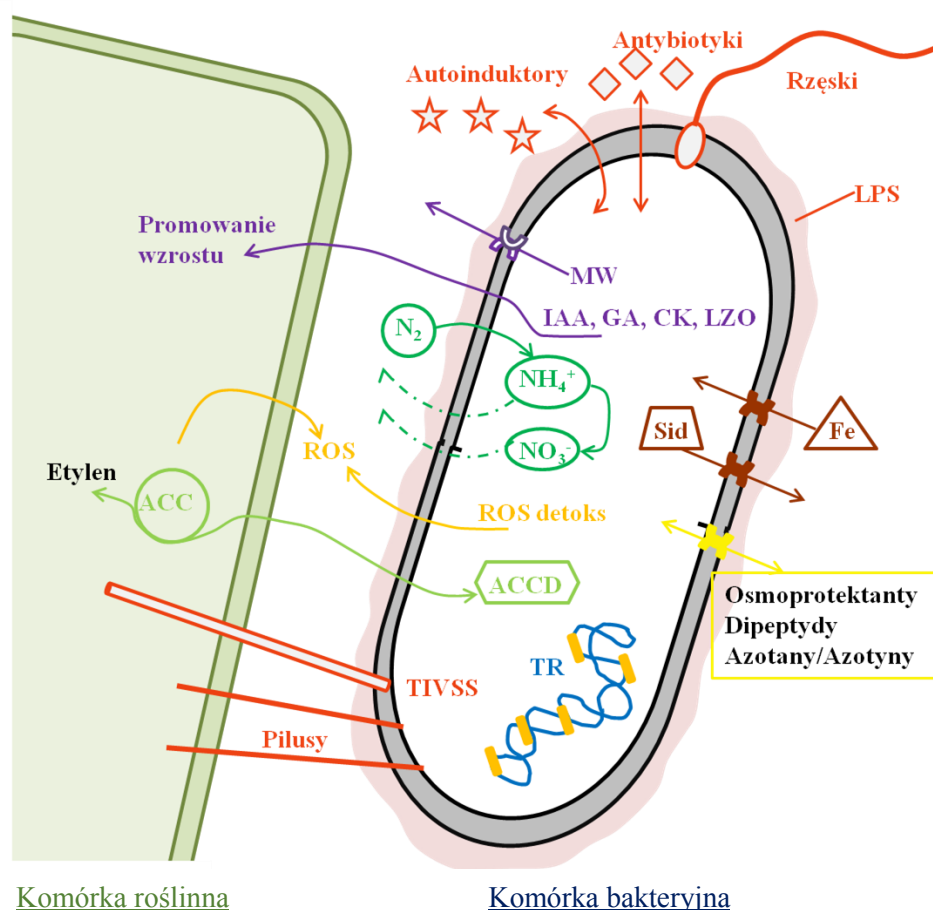
Proces kolonizacji tkanek roślinnych jest wieloetapowy oraz uwarunkowany rozpoznaniem roślina-endofit na poziomie molekularnym (Piński i Hupert-Kocurek, 2016). Bakterie endofityczne posiadają szereg cech, które warunkują ich zdolność do efektywnej kolonizacji rośliny, a także umożliwiają funkcjonowanie w tkankach gospodarza (Rys. 3). Analiza funkcjonalnych bakteryjnych mutantów delecyjnych, pozwoliła wyróżnić te właściwości endofitów, które pełnią istotną rolę w procesie wnikania, rozprzestrzeniania i oddziaływania z roślinnym gospodarzem. Za najważniejsze uważa się te cechy, które

determinują: zdolność do chemotaksji, aktywnego ruchu, adhezji, tworzenia biofilmu, Quorum Sensing (QS), produkcji enzymów degradujących ścianę komórkową (CWDE, ang. cell wall degrading enzymes), oporność na stres oksydacyjny i osmotyczny, sekrecję i translokację białek efektorowych (TISS-TVISS, ang. secretion systems I-VI), syntezę LPS i egzopolisacharydu (EPS) (Piński i Hupert-Kocurek, 2016). U bakterii endofitycznych cechy te nie zawsze występują jednocześnie (Santoyo i wsp., 2016).

Oprócz ruchu chemotaktycznego niezwykle ważna u bakterii jest zdolność do aktywnego poruszania się za pomocą rzęsek i/lub fimbrii typu IV. Ruch odgrywa istotną rolę podczas wnikania bakterii do nasion, korzeni i zajmowania kolejnych organów i tkanek. Ruch drgający, uwarunkowany obecnością fimbrii typu IV, zapewnia efektywną kolonizację tkanek ryżu bakteriom *Azoarcus* sp. BH72. Dzięki tym fimbriom, bakterie ściśle przylegają do epidermy korzeni i tworzą mikrokolonie. Mutanty tych szczepów, mające zmiany w genie *pilT*, wytwarzały fimbrie niezdolne do ruchu, co w sposób znaczący pozbawiło *Azoarcus* sp. BH72 możliwości inwazji i kolonizacji roślin (Bohm i wsp., 2007). Zdolność do aktywnego ruchu, to cecha wyróżniająca bakterie endofityczne, co potwierdzono w badaniach nad mikrobiomem pszenicy, w którym liczba bakterii aktywnie poruszających się była wewnątrz korzeni pięć razy większa, niż w przyległej do nich ryzosferze (Hung i wsp., 2007). W innych badaniach wykazano, że większość bakterii endofitycznych wyizolowanych z nasion ryżu było zdolnych do ruchu, co pozwalało tym szczepom na migrację w kierunku nasion podczas ich zawiązywania (Ebeltagy i wsp., 2000; Okunishi i wsp., 2005).

Szczepy bakterii endofitycznych posiadają wiele struktur odpowiedzialnych za ściśle przyleganie i związanie się z epidermą korzenia. Adhezja komórek bakterii do powierzchni korzenia uwarunkowana jest występowaniem u bakterii polimerów zewnątrzkomórkowych, LPS-u i białek ściany komórkowej, a także struktur zewnątrzkomórkowych (rzęsek, fimbrii). Analiza genomu endofitycznego szczepu *Enterobacter* sp. 638, potwierdziła obecność kilkunastu genów kodujących białka biorące udział w adhezji do powierzchni korzeni takich jak: hemaglutyniny, fimbrie typu I i IV, amyloidowe fimbrie spiralne (ang. curly fibers), a także otoczkowe polisacharydy. Wiele z tych genów obecnych jest na wyspach genowych i/lub plazmidach, co sugeruje, że zostały nabyte na drodze horyzontalnego transferu genów (Taghavi i wsp., 2010). U szczepu *Azospirillum brasilense* Cd rolę adhezyny pełni główne białko zewnątrz błonowe (MOMP, ang. major outer membrane protein), zapewniające agregację komórek bakteryjnych na powierzchni korzenia, a dodatkowo, zaangażowane w rozpoznanie właściwego gospodarza (Burdman i wsp., 2001).





Rys. 3. Cechy bakterii endofitycznych warunkujące kolonizację i oddziaływanie z rośliną. Auksyna (IAA), gibereliny (GA), cytokininy (CK), lotne związki organiczne (LZO), metabolity wtórne (MW) przenoszone są do komórek gospodarza wpływając m.in. na wzrost rośliny (fioletowy). Struktury komórki bakteryjnej (fimbrie, pilusy), białka efektorowe wydzielane przez systemy sekrecji i translokacji (np. TIVSS), LPS, autoinduktory, antybiotyki aktywują indukowaną odporność systemiczną u roślin (czerwony). ACC (ang. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate acid, kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy), bezpośredni prekursor etylenu, rozkładany przez bakteryjny enzym deaminazę ACC (ACCD) (jasnozielony). Grupa enzymów detoksykujących reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS detoks) (pomarańczowy). Wiązanie azotu atmosferycznego ( $N_2$ ) i aktywny transport  $NH_4^+$  i  $NO_3^-$  do gospodarza (ciemnozielony). Wytwarzanie sideroforów (Sid) i wychwytywanie żelaza (Fe) (brązowy). Substraty transportowane przez kanały błonowe (żółty). Regulatory transkrypcji (TR) (pomarańczowy) (Hardoim i wsp., 2015, zmienione).

Mechanizm QS pozwala bakteriom na komunikowanie się i regulację wielu procesów, w tym także tworzenie biofilmu, adhezję do powierzchni korzenia i kolonizację tkanek rośliny. Bakterie wydzielają autoinduktory, czyli cząsteczki sygnałowe, regulujące ekspresję określonych genów w populacji bakterii zasiedlających wspólną niszę ekologiczną (Dourado i wsp., 2014). U bakterii Gram-ujemnych autoinduktorami są acylowe pochodne

laktanu homoseryny (AHL, ang. N-acylated L-homoserine lactone). U *Methylobacterium* spp. cząsteczki AHL wpływają na zwiększenie ekspresji genów związanych z oddziaływaniem bakteria-gospodarz. Z drugiej jednak strony, rośliny mogą regulować bakteryjny mechanizm QS poprzez produkcję związków reagujących z receptorami AHL. W wyniku tych oddziaływań sygnał przekazywany przez te receptory może być wzmacniany, wyciszany lub hamowany (Gao i Teplitski, 2003).

Mikrobiologiczny rozkład polimerów wchodzących w skład ściany komórkowej jest złożony, a w jego degradacji uczestniczy kilka grup enzymów hydrolitycznych CWDE, takich jak: celulazy, glukanazy, celobiazy, chitynazy, ksylanazy, pektynazy i poligalakturonazy. Kompleksy enzymów CWDE są produkowane przez bakterie endofityczne we wczesnej fazie wnikania do tkanek roślinnych (Hardoim i wsp., 2008). Ich aktywność wydaje się być ważna dla bakterii endofitycznych, ponieważ 50-62% izolatów posiada zdolność do produkcji endoglukanazy czy innych enzymów celulolitycznych (Elbeltagy i wsp., 2001; Castro i wsp., 2014; Kukla i wsp., 2014b). Ponadto, u szczepów z nieaktywnymi genami kodującymi syntezę endoglukanazy czy endopoligalakturonazy, nie obserwowano wydajnej kolonizacji epidermy korzenia. Endofity te nie miały również możliwości systemicznego rozprzestrzeniania się w pozostałych organach rośliny (Compant i wsp., 2005; Reinhold-Hurek i wsp., 2006). W odróżnieniu od fitopatogenów, bakterie endofityczne wytwarzają CWDE w znacznie mniejszym stężeniu (Elbeltagy i wsp., 2001).

Bakterie endofityczne wykształciły mechanizmy oporności na obecne w tkankach roślinnych reaktywne formy tlenu (ROS, ang. reactive oxygen species), a także związki mające działanie antybiotyczne (Fouts i wsp., 2008; Rasche i wsp., 2009). W genomach bakterii endofitycznych zidentyfikowano geny kodujące enzymy zaangażowane w detoksykację ROS takie jak: S-transferaza glutationowa, reduktaza glutationowa, dysmutaza nadtlenkowa, peroksyreduktaza, chloroperoksydaza i katalaza (Fouts i wsp., 2008; Taghavi i wsp., 2010; Wu i wsp., 2010; Sessitsch i wsp., 2012; Alqueres i wsp., 2013; Hardoim i wsp., 2015). Mnogość i różnorodność tych enzymów wskazuje na istotność tego mechanizmu dla prawidłowego funkcjonowania endofitów. Ponadto, u bakterii endofitycznych zidentyfikowano kompleksy białkowe odpowiedzialne za usuwanie fitoaleksyn. Są to związki produkowane przez rośliny w celu obrony przed fitopatogenami, których stężenie fitoaleksyn wzrasta w wyniku infekcji lub działania czynników abiotycznych na tkanki roślin (Fouts i wsp., 2008; Rasche i wsp., 2009).

Ważną cząsteczką sygnałową u roślin jest kwas salicylowy, biorący udział w regulacji nabytej odporności systemicznej (SAR, ang. systemic acquired resistance).

W genomie bakterii endofitycznych *Pseudomonas fluorescens* PICF7 zidentyfikowano geny kodujące enzym rozkładający kwas salicylowy (hydroksylaza salicylowa). W ten sposób endofity mogą zakłócać, wyciszać lub hamować SAR indukowaną podczas kolonizacji tkanek roślinnych przez fitopatogeny (Martinez-Garcia i wsp., 2015).

Systemy sekrecji pełnią kluczową rolę w infekcji, wirulencji czy patogenezie oraz warunkują występowanie interakcji między bakteriami endofitycznymi a roślinami (Reinhold-Hurek i Hurek, 2011; Hardoim i wsp., 2015). U bakterii Gram-ujemnych opisano sześć systemów sekrecji (TISS-TVISS). Typ I, II, V oraz VI zidentyfikowano u endofitycznych szczepów, typ III i IV występuje głównie u bakterii patogennych (Ali i wsp., 2014). Pomimo, iż aktywacja TIISS oraz TIVSS jest uwarunkowana bezpośrednim kontaktem komórki bakteryjnej i gospodarza, systemy te rzadko identyfikowane są wśród szczepów bakterii endofitycznych. Świadczyć to może o odmiennym mechanizmie oddziaływania endofitów z komórkami roślinnymi, niż inaktywacja systemu odpornościowego gospodarza czy zniszczenie zainfekowanej tkanki, a to charakteryzuje szczepy patogenne. Najczęściej u bakterii kolonizujących tkanki roślinne występują systemy sekrecji typu V oraz VI. Są one ważne dla prawidłowego przebiegu procesów adhezji, tworzenia biofilmu, koniugacji, QS oraz wirulencji (Boyer i wsp., 2008). Szczególną rolę w optymalizacji oddziaływań bakterie endofityczne-roślina upatruje się w TVISS, ponieważ zdecydowana większość endofitów posiada geny *hcp*, kodujące kluczowe białka tworzące kanał błonowy tego systemu (Sessitsch i wsp., 2012). Badania Bernal i wsp. (2017) wskazują na dotąd nieznaną funkcję TVISS. U bakterii endofitycznych *Pseudomonas putida* KT2440 system ten transportuje zewnątrzkomórkowo specyficzne białka efektorowe o silnym działaniu antybakteryjnym. W ten sposób endofity *P. putida* KT2440 mogą chronić swojego gospodarza przed atakiem fitopatogenów, takich jak *Xanthomonas campestris*.

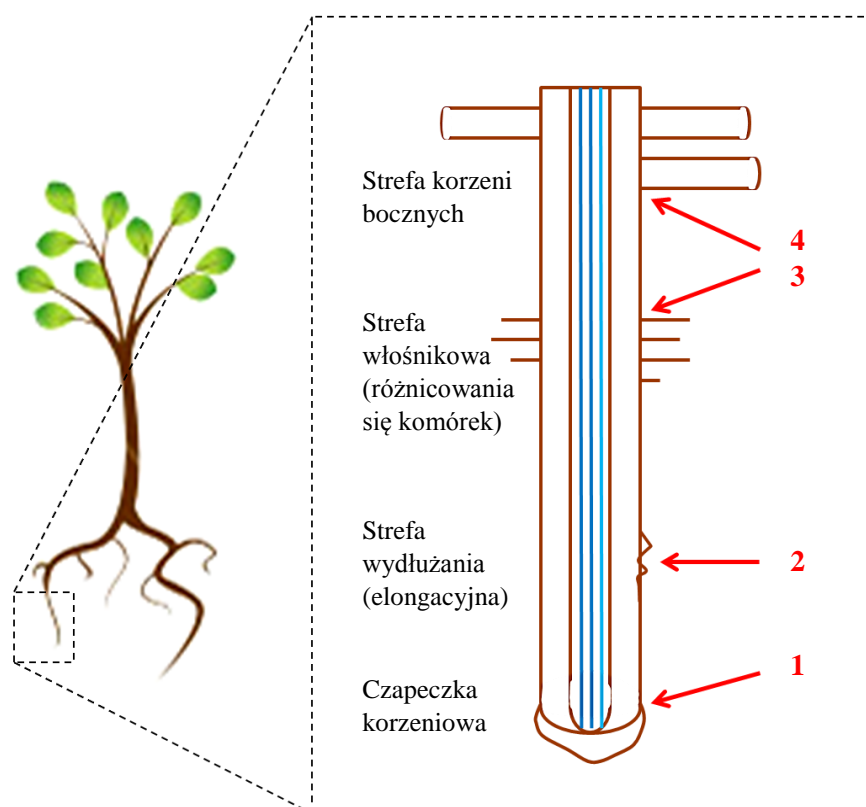
### 1.4.3. Proces kolonizacji

Proces kolonizacji tkanek roślinnych jest niezbędnym etapem zapewniającym zawiązanie ścisłych zależności między bakteriami a rośliną. Głównymi drogami wejścia endofitów do rośliny są miejsca powstawania korzeni bocznych (nasada korzeni bocznych), wierzchołek wzrostu korzenia głównego, włosniki oraz tak zwane „hot spots” czyli miejsca, w których epiderma korzenia uległa uszkodzeniu w wyniku działania czynników abiotycznych i/lub biotycznych (np. działanie fitopatogenów). Proces wnikania bakterii endofitycznych do rośliny może odbywać się także przez brodawki korzeniowe, przetchlinki,

otwarte aparaty szparkowe oraz uszkodzoną epidermę części nadziemnych rośliny (Rys. 4). Drogi te mają jednak niewielkie znaczenie, w porównaniu z kolonizacją tkanek w strefie wzrostu korzenia. Dlatego, źródłem bakterii endofitycznych najczęściej jest ryzosfera (Hardoim i wsp., 2008; Weyens i wsp., 2009c,d; Khan i wsp., 2013; Hardoim i wsp., 2015; Pawlik i wsp., 2015).

Badania wykorzystujące techniki obrazowania struktury materiału biologicznego (np. mikroskopia elektronowa, znakowanie białkiem zielonej fluorescencji) pokazują, że mikroorganizmy endofityczne mogą pozostawać w miejscu wnikięcia do rośliny i/lub migrować przez apoplast i/lub system wiązek przewodzących (Hardoim i wsp., 2008, 2015; Reinhold-Hurek i Hurek, 2011). Dzięki temu, bakterie endofityczne kolonizują przestrzenie międzykomórkowe, ksylem oraz tkanki określonych organów (korzenie, łodygi, liście, owoce, nasiona). Migrację bakterii z rodzaju *Pseudomonas* obserwowali w swoich badaniach Garbeva i wsp. (2001). Po miesiącu od inokulacji siewek ziemniaka (*Solanum tuberosum*), szczepy *Pseudomonas* sp. zostały zidentyfikowane nie tylko w korzeniach, ale także w łodygach tych roślin. Ponadto, badania Wagner i wsp. (2016) wykazały, że znaczna część mikrobiomu korzeni i liści jest podobna, co wskazuje na drogę kolonizacji bakterii endofitycznych z gleby przez korzenie do liści.

Proces kolonizacji zwykle rozpoczyna się od rozpoznania przez bakterie związków obecnych w wydzielinach korzeniowych, będących mieszaniną wielu złożonych, często gatunkowo specyficznych substancji, które selektywnie przyciągają wybrane szczepy bakterii (Bais i wsp., 2006; Rudrappa i wsp., 2008). Wydzieliny korzeniowe mogą zawierać węglowodany, aminokwasy, kwasy organiczne, związki fenolowe i/lub flawonoidy (Bacilio-Jimenez i wsp., 2003; Bais i wsp., 2006; Rosenblueth i Martinez-Romero, 2006), a bakterie endofityczne są zdolne do ich rozpoznawania, jak i wykorzystania, jako źródło węgla. W badaniach Yuan i wsp. (2015) stwierdzono, że kwasy organiczne (szczawiowy, jabłkowy, fumarowy), będące główną składową wydzielin korzeniowych banana (*Musa acuminata*, grupa AAA, podgrupa Cavendish), indukują chemotaksję i tworzenie biofilmu u *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6. Obserwowano również, że pod wpływem flawonoidów, w komórkach bakterii dochodzi do aktywacji genów kodujących białka zaangażowane w proces kolonizacji tkanek roślinnych (Bais i wsp., 2004). Bakterie *Serratia* spp. zdecydowanie efektywniej kolonizowały sadzonki ryżu, jeżeli w środowisku obecne były flawonoidy (Balachandar i wsp., 2006).



Rys. 4. Miejsca kolonizacji i wnikania bakterii endofitycznych do rośliny (czerwone strzałki). Oznaczenia: 1-wierzchołek wzrostu; 2-„hot spots” (uszkodzenia epidermy); 3-włosniki; 4-miejsca powstawania korzeni bocznych (Reinhold-Hurek i Hurek, 1998, zmienione).

Kolejnym etapem wnikania bakterii do gospodarza, jest adhezja komórek bakterii na powierzchni korzenia. W procesie przylegania można zaobserwować dwa główne etapy: adhezję wstępną oraz adhezję nieodwracalną. Pierwszy etap, ma charakter odwracalny i uwarunkowany jest przez oddziaływania fizyczne oraz słabe oddziaływania międzycząsteczkowe typu van der Waalsa, które pozwalają bakteriom na zbliżenie się do powierzchni korzenia. Adhezja odwracalna jest na tyle nietrwała, że komórki bakteryjne można usunąć za pomocą środków fizycznych, bądź chemicznych. Etap drugi-nieodwracalna adhezja, warunkowana jest przez adhezyny powierzchni komórek bakterii, polimery polisacharydowe, rzęski i/lub fimbrie. Zapewniają one zakotwiczenie bakterii na powierzchni korzenia. Warunkiem tworzenia mikrokolonii i biofilmu jest osiągnięcie przez bakterie etapu adhezji nieodwracalnej (Taghavi i wsp., 2010; Kołwzan, 2011).

Ściana komórkowa roślin, w miejscu przylegania bakterii, ulega uszkodzeniu dzięki działaniu enzymów CWDE. Część bakterii endofitycznych pozbawionych jest zdolności do produkcji tej grupy enzymów i wnika do wnętrza rośliny w miejscach przerwania ciągłości

epidermy korzenia. Natomiast, systemiczne rozprzestrzenianie się bakterii endofitycznych w roślinie jest związane z produkcją enzymów z grupy CWDE (Hardoim i wsp., 2008). Dzięki aktywności pektynaz, endofity mogą degradować blaszkę środkową, znajdującą się pomiędzy ścianami komórek roślinnych i w ten sposób rozprzestrzeniać się w całej roślinie (Sessitsch i wsp., 2012).

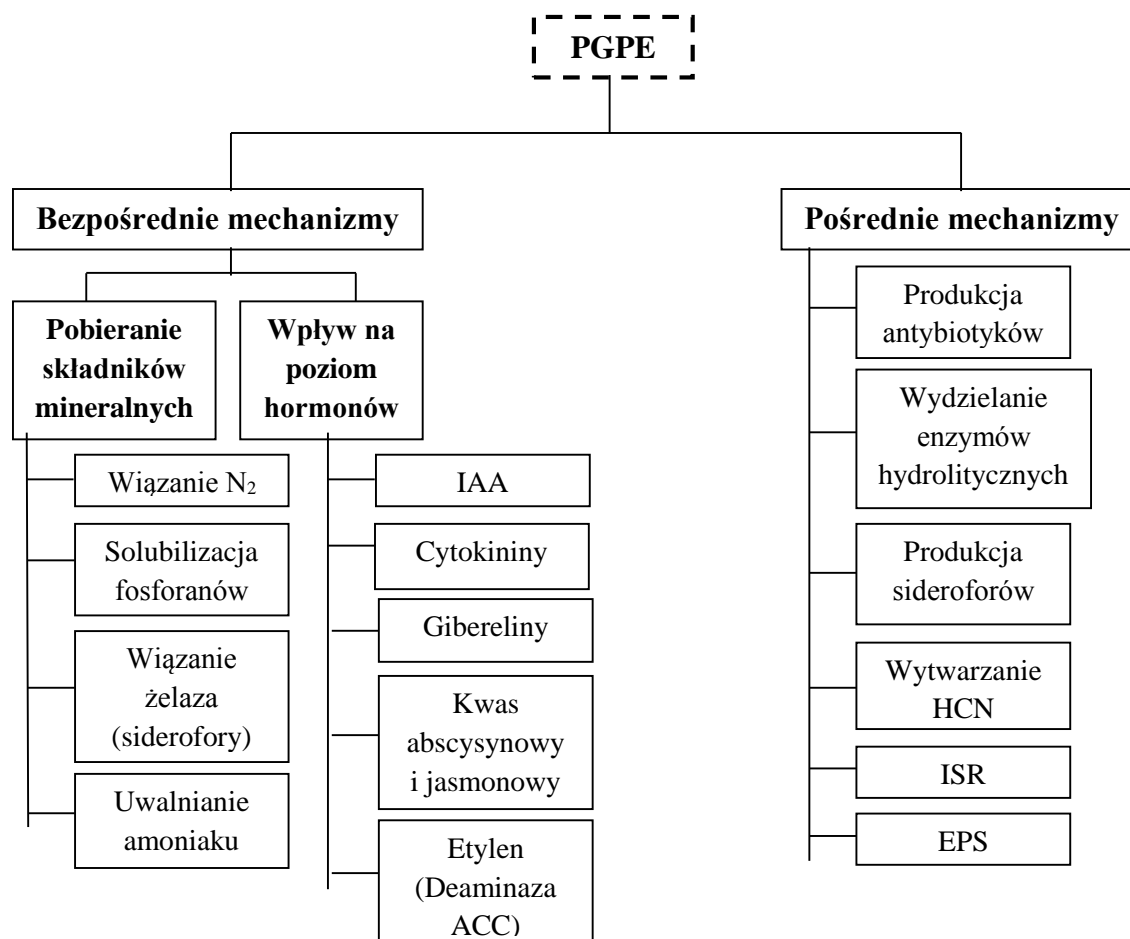
### **1.5. Endofity promujące wzrost roślin**

Wiele bakterii endofitycznych wywiera korzystny wpływ na swojego gospodarza, stymulując jego wzrost i rozwój. Wyniki ostatnich badań wskazują, że endofity poprawiają kondycję i zwiększają zdolności adaptacyjne roślin do niekorzystnych warunków środowiska takich jak: nadmierne zasolenie gleby (Sgroy i wsp., 2009), brak wody, zanieczyszczenie pestycydami (Becerra-Castro i wsp., 2011), metalami ciężkimi (Ma i wsp., 2016) czy węglowodorami (Khan i wsp., 2013). Uważa się, że bakterie endofityczne są „rozbrojonymi” patogenami, ze względu na obecność genów homologicznych w ich genomach, powstałych w wyniku specjacji (ortologi), które występują także u bakterii patogennych (Ali i wsp., 2014).

Wśród bakterii endofitycznych od kilku lat szczególnym zainteresowaniem cieszą się tzw. endofity promujące wzrost roślin (PGPE, ang. plant growth-promoting endophytes), które posiadają szereg mechanizmów potencjalnie odpowiedzialnych za stymulację wzrostu i rozwoju roślin, przyrost biomasy i poprawę żywotności swojego gospodarza. PGPE mogą oddziaływać na rośliny w sposób bezpośredni i/lub pośredni (Rys. 5) (Gaiero i wsp., 2013; Khan i wsp., 2013; Afzal i wsp., 2014; Santoyo i wsp., 2016). Mogą one wspomagać wzrost roślin poprzez wiązanie i/lub mobilizację trudno dostępnych składników mineralnych (azot, fosfor, żelazo) lub syntezę związków regulujących wzrost i rozwój roślin (fitohormony, amoniak), a także konkurując z fitopatogenami o miejsce i składniki pokarmowe (Weyens i wsp., 2009a,b,c,d; Hardoim i wsp., 2015; Pawlik i wsp., 2015; Santoyo i wsp., 2016).

Do bezpośrednich mechanizmów promujących wzrost roślin zalicza się wiązanie azotu atmosferycznego, produkcję fitohormonów (auksyn, giberelin, cytokinin, kwasu abscysynowego i jasmonowego), syntezę deaminazy kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (ACC, ang. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate acid), wydzielanie sideroforów, uwalnianie amoniaku oraz fosforu z jego nierozpuszczalnych soli. Mechanizmy pośrednie związane są z konkutowaniem o składniki pokarmowe, kontrolą wzrostu fitopatogenów poprzez produkcję antybiotyków, cyjanowodoru (HCN), indukowaniem

odporności systemicznej (ISR, ang. induced systemic resistance), syntezą enzymów rozkładających ścianę fitopatogenów, degradacją toksyn wydzielanych przez fitopatogeny, a także usuwaniem substancji hamujących wzrost roślin np. przez rozkład zanieczyszczeń organicznych (Glick, 2012; Khan i wsp., 2013; Kukla i wsp., 2014a; Pawlik i wsp., 2015).



Rys. 5. Mechanizmy promujące wzrost roślin występujące u szczepów PGPE.

Azot, fosfor i żelazo są pierwiastkami najczęściej limitującymi wzrost roślin, ponieważ ich ilość i dostępność w glebie często jest niewystarczająca. Udowodniono, że bakterie endofityczne wiążące azot atmosferyczny (diazotrofy) *Acetobacter diazotrophicus* PA15 wyraźnie stymulowały wzrost trzciny cukrowej (*Saccharum officinarum*) w warunkach niedoboru azotu w glebie. Poziom związanego azotu w roślinnych tkankach inokulowanych bakteriami wiążącymi N<sub>2</sub> może wzrosnąć nawet o 60%, w porównaniu z roślinami nieinokulowanymi (Boddey i wsp., 1995). Ilość związanego i dostarczanego przez bakterie endofityczne azotu swoim roślinnym gospodarzom może się znacznie różnić. Na przykład, w tkankach dzikiego ryżu (*Oryza officinalis*) inokulowanego *Herbaspirillum* sp. B501

zawartość związanego izotopu  $^{15}\text{N}$  zwiększyła się, aż o 381% w stosunku do kontroli, która nie była traktowana bakteriami (Elbeltagy i wsp., 2001). Natomiast, kolonizacja tkanek ryżu przez *Burholderia* sp. spowodowała zwiększenie zawartości azotu w tkankach tej rośliny o 31% (Baldani i wsp., 2000). Uważa się, że zaobserwowane różnice są związane z odmianą i stadium rozwojowym rośliny, a zależą od szczepu bakterii endofitycznej, metody inokulacji i warunków, w których były prowadzone doświadczenia.

Wiele bakterii endofitycznych, poprzez wydzielanie małowcząsteczkowych kwasów organicznych i fosfataz, ułatwia rozpuszczanie fosforanów, a tym samym dostarcza fosfor roślinom. Podobnie bakterie ułatwiają roślinom pobieranie żelaza. Wiele bakterii endofitycznych wytwarza małowcząsteczkowe związki organiczne zwane sideroforami, tworzące kompleksy z żelazem ( $\text{Fe}^{3+}$ ), które mogą być pobierane przez rośliny (Compant i wsp., 2010; Santoyo i wsp., 2016). Szczególne zainteresowanie skupiają na sobie bakterie produkujące fitohormony i deaminazę ACC (Glick i wsp., 2007; Glick, 2014). Jednym z najczęściej opisywanych fitohormonów produkowanych przez endofity jest kwas indolilo-3-octowy (IAA), który należy do grupy auksyn. IAA wpływa na wzrost wydłużeniowy korzeni, indukuje podziały komórkowe i wzrost korzeni bocznych, ale również reguluje odpowiedź systemu odpornościowego rośliny. Co ciekawe, IAA może pełnić funkcję cząsteczki sygnałnej w procesie QS u bakterii uczestniczących w tworzeniu biofilmu (Spaepen i Vanderleyden, 2011). Fitopatogeny wytwarzają IAA z indolilo-3-acetamidu (szlak IAM, ang. indole-3-acetamide), w odróżnieniu od bakterii symbiotycznych, u których IAA powstaje przez kwas indolilo-3-pirogronowy (szlak IPyA, ang. indole-3-pyruvate) (Spaepen i Vanderleyden, 2011). Przykładowo, bakterie endofityczne zdolne do uwalniania auksyny w wysokich stężeniach powodowały szybszy wzrost roślin, zwiększały ich biomasę, liczbę liści, a także indukowały szybsze ukorzenianie się sadzonek (Sessitsch i wsp., 2005; Compant i wsp., 2008; Shi i wsp., 2009).

Ważnym mechanizmem bezpośredniej promocji wzrostu roślin przez bakterie endofityczne jest wytwarzanie enzymu deaminazy ACC. Enzym ten katalizuje hydrolizę kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego (prekursor biosyntezy etylenu), do amoniaku i kwasu  $\alpha$ -ketomasłowego (Glick i wsp., 2007; Glick, 2012, 2014). Dzięki temu dochodzi do zmniejszenia poziomu etylenu w tkankach roślinnych. Etylen jest tzw. hormonem stresu, „starzenia się” i odpowiada między innymi za dojrzewanie owoców czy hamowanie wzrostu wydłużeniowego korzeni. Aktywność bakteryjnej deaminazy ACC wpływa pozytywnie na wydłużenie łodyg i korzeni, zwiększenie biomasy, znacznie redukując negatywny wpływ etylenu na rozwój rośliny (Belimov i wsp., 2009; Sadriani i wsp., 2011). Potwierdzają



to badania Mayak i wsp. (2004), którzy analizowali wpływ endofitów *Achromobacter piechaudii* ARV8, zdolnych do produkcji deaminazy ACC, na przyrost biomasy siewek pomidora. Wyniki ich badań wykazały, że sadzonki inokulowane *A. piechaudii* ARV8 wytwarzały czterokrotnie większą biomasę, w porównaniu do nieinokulowanej kontroli, co było spowodowane obniżeniem poziomu etylenu w tkankach pomidora o około 75% w porównaniu do roślin nieinokulowanych.

Liczne bakterie endofityczne znane są z antagonistycznego działania wobec patogennych bakterii i grzybów. Mikroorganizmy te konkurują o niszę ekologiczną oraz mikro- i makroelementy. Ardanov i wsp. (2011) zastosowali dwa gatunki bakterii endofitycznych: *Pseudomonas* sp. oraz *Methylobacterium* sp., jako czynniki kontroli biologicznej w uprawie ziemniaków. Inokulacja roślin zawiesiną tych bakterii skutecznie chroniła plony przed patogenem *Pectobacterium atrosepticum* (*Erwinia carotovora* supp. *atroseptica*), który wywołuje chorobę zwaną czarną nóżką. Oba szczepy endofitów nie tylko indukowały odporność roślin, ale także promowały wzrost ich pędów. Z kolei, odporność przeciw grzybowym patogenom *Verticillium* sp. oraz *Botrytis cinerea* uzyskiwały pomidory oraz winorośl inokulowane bakteriami endofitycznymi *Bacillus phytofirmans* PsJN (Compant i wsp., 2008; Bordiec i wsp., 2011). Podobnie, ochronny wpływ bakterii endofitycznych *Paenibacillus xylanilyticus* YUPP-1, *Paenibacillus polymyxa* YUPP-8 oraz *Bacillus subtilis* YUPP-2, na uprawy bawełny (*Gossypium* L.), obserwowali Yang i wsp. (2013). Wyniki doświadczeń polowych wykazały, że porażenie pleśniami było widoczne tylko u 5,2% roślin inokulowanych endofitami, podczas gdy u roślin nieinokulowanych, poziom ten wynosił 33,5%.

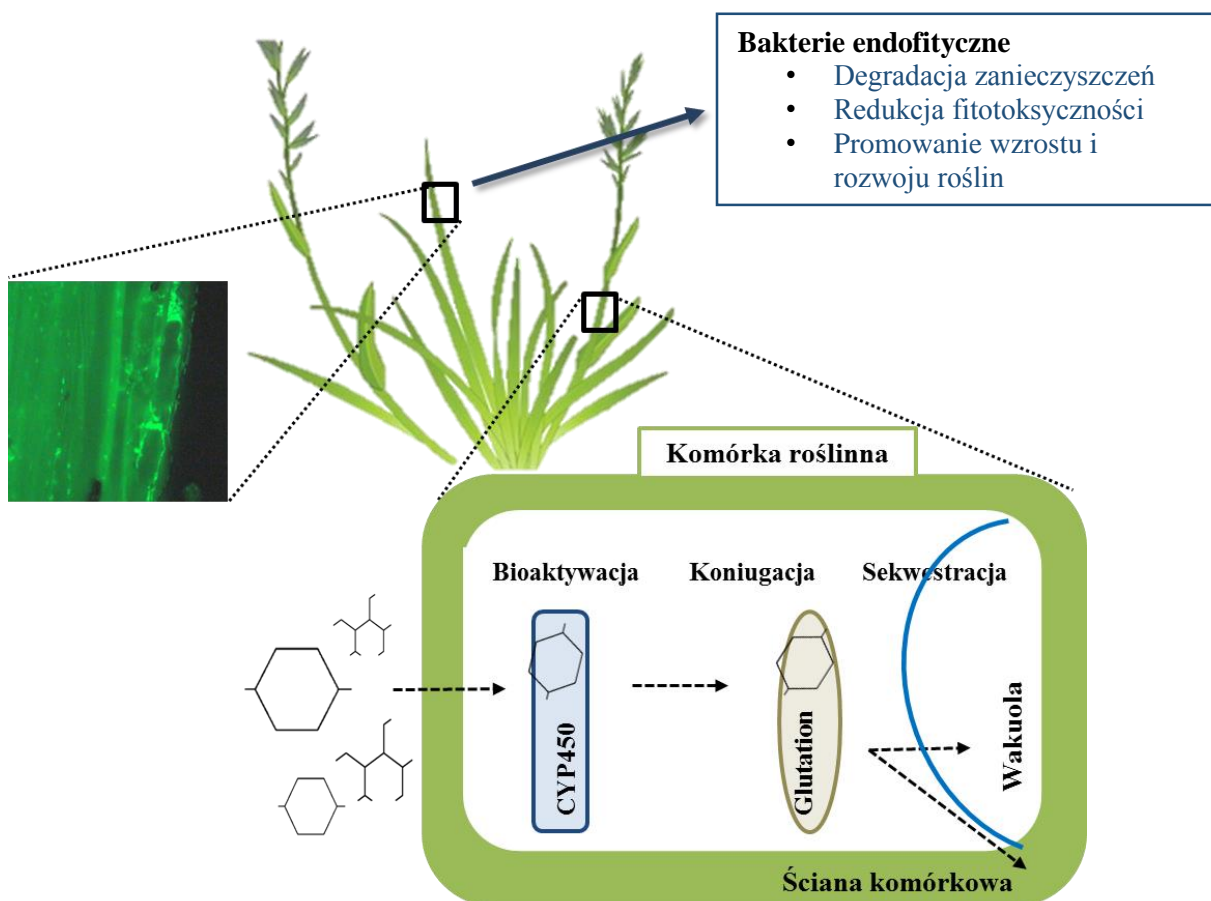
## 1.6. Fitoremediacja wspomagana przez bakterie endofityczne

Bakterie endofityczne wykorzystywane mogą być również do wspomagania procesów fitoremediacji terenów skażonych wieloma związkami organicznymi, na przykład: związkami ropopochodnymi, pestycydami, chloroformem, nitrobenzenem, dichlorodifenylotrichloroetanem (DDT), polichlorowanymi bifenylami lub nitrylami (Barac i wsp., 2004; McGuinness i Dowling, 2009; Khan i wsp., 2013; Thijs i wsp., 2014; Saleem, 2016).

Głównym czynnikiem warunkującym skuteczność fitoremediacji jest dostępność zanieczyszczeń organicznych. Losy tych związków w środowisku, zdolność do absorpcji na cząsteczkach gleby bądź powierzchni korzeni, możliwość ich pobierania przez roślinę

i mikroorganizmy, aktywność biologiczną, powinowactwo do fazy lipidowej/wodnej, opisuje logarytm współczynnika podziału n-oktanol/woda ( $\log K_{ow}$ ) (Weyens i wsp., 2009c,d; Khan i wsp., 2013; Afzal i wsp., 2014). Związki ropopochodne, dla których  $\log K_{ow} < 1$ , są hydrofilowe, bardzo dobrze rozpuszczają się w wodzie, ulegają akumulacji i adsorpcji przez korzenie, jednak nie są pobierane przez włosniki (Dzantor, 2007). W przypadku zanieczyszczeń, gdzie  $\log K_{ow} > 3,5$ , obserwuje się wysokie powinowactwo związków organicznych do powierzchni korzeni i ich silną akumulację, a także zatrzymywanie we frakcji lipidowej epidermy korzenia, przez co nie są one transportowane do łodyg i liści. Umiarkowanie hydrofilowe związki ropopochodne, których  $\log K_{ow}$  mieści się w przedziale 0,5-3,5, przenikają przez błony komórkowe, co powoduje, że są najłatwiej pobierane przez korzenie i transportowane do pozostałych organów (Marecik i wsp., 2006; Weyens i wsp., 2009c,d; Afzal i wsp., 2014).

Rośliny, które są fotoautotrofami, nie wykorzystują pobranych egzogennych zanieczyszczeń organicznych jako źródła węgla i energii, ponieważ węgiel asymilują na drodze fotosyntezy. Drogi przemian tych związków organicznych w komórkach roślinnych zostały opisane przez tzw. model zielonej wątroby (green liver concept), ze względu na podobieństwo do systemu ich detoksykacji w wątrobie ssaków (Sanderman, 1992; Weyens i wsp., 2009c,d; Saleem, 2016) (Rys. 6). Obecne w tkankach roślin toksyczne związki organiczne podlegają szeregowi reakcji, które obniżają czas ich półtrwania oraz ograniczają ich kontakt z tkankami roślin. Według modelu zielonej wątroby związki te ulegają przekształceniu w trzech etapach: (1) bioaktywacji, czyli enzymatycznej modyfikacji związku, obniżającej jego toksyczność i/lub liofilowość; (2) koniugacji z glutationem, cukrami lub aminokwasami w celu wytworzenia związku hydrofilowego; (3) sekwestracji/kompartmentacji, polegającej na odkładaniu zmodyfikowanego związku w wakuoli i/lub ścianie komórkowej (Sanderman, 1992; Weyens i wsp., 2009b,c,d; Saleem, 2016) (Rys. 6).



Rys. 6. Oddziaływania rośliny-bakterie endofityczne w fitoremediacji oraz model zielonej wątroby opisujący drogi przemian ksenobiotyków w komórkach roślinnych.

U roślin model zielonej wątroby opisuje włączenie toksycznych związków organicznych w cykle przemian z wykorzystaniem szlaków podstawowego metabolizmu. W pierwszej fazie, ksenobiotyki są przekształcane, w reakcjach utleniania, hydrolizy i redukcji, w związki o mniejszej toksyczności. Kluczową rolę odgrywają reakcje utleniania z udziałem cytochromów P450, które obejmują rodzinę enzymów roślinnych o szerokiej specyficzności substratowej. W drugiej fazie, do powstałych związków, przyłączane są endogenne substraty roślinne o małej aktywności biologicznej (aminokwasy, peptydy, węglowodany, kwasy karboksylowe). Reakcje te katalizują glikozylotransferazy, a kluczowym substratem biorącym udział w reakcjach sprzęgania jest glutation. Reakcja pomiędzy glutatnionem, a aktywowanymi ksenobiotykami może zachodzić spontanicznie bądź być katalizowana przez S-transferazę glutationową. Tak koniugowane związki mogą ulegać dalszym przemianom. Bardzo rzadko dochodzi jednak do całkowitej mineralizacji tych zanieczyszczeń, ponieważ powstałe pochodne często hamują aktywność kolejnych enzymów detoksykacyjnych (Dua i wsp., 2002; Soleimani i wsp., 2010; Taghavi i wsp., 2010).

W konsekwencji, w trzeciej fazie, otrzymane intermediaty zostają z cytoplazmy usunięte oraz zmagazynowane w wakuoli i/lub ścianie komórkowej, w postaci mniej toksycznych form tych związków, na ogół jako kompleksy z innymi substancjami (Sanderman, 1992). Jednak, aby zanieczyszczenia mogły być w pełni rozłożone do dwutlenku węgla i wody, konieczna jest obecność mikroorganizmów. Szczególne znaczenie odgrywają tu endofity, zdolne do degradacji toksycznych związków organicznych (Rys. 6).

Endofity uważane są za ważne narzędzia zwiększające efektywność fitoremediacji toksycznych związków organicznych. Wykorzystanie tych bakterii w procesach fitoremediacji wydaje się być szczególnie obiecujące, ponieważ wchodzi one w ścisłe interakcje ze swoim gospodarzem (Saleem, 2016; Santoyo i wsp., 2016). Szereg właściwości bakterii endofitycznych powoduje, że w kooperacji z roślinami mogą istotnie zwiększać tempo usuwania toksycznych substancji ze środowiska (Porteous-Moore i wsp., 2006; Yousaf i wsp., 2011; Khan i wsp., 2013). Zdolność endofitów do rozkładu tych związków może wynikać z ich ewolucyjnego przystosowania do rozkładu metabolitów roślinnych, z których wiele ma strukturę pierścieniową (van Beilen i wsp., 2006; van Bogaert i wsp., 2011).

Korzystny wpływ roślin i mikroorganizmów na procesy rozkładu substancji ropopochodnych obserwowali Ying i wsp. (2011). Wykazali oni, że stężenie TPH (ang. total petroleum hydrocarbons, indeks oleju mineralnego) w ryzosferze trzech różnych gatunków roślin, po przeprowadzonym doświadczeniu bioremediacyjnym obniżyło się tak, że nie przekraczało dopuszczalnego poziomu. Badania Ho i wsp. (2012) pokazały, jak ważne są bakterie endofityczne, zdolne do rozkładu fenolu, związku silnie hamującego wzrost roślin. Inokulacja rośliny *A. thaliana* zawiesiną bakterii endofitycznej *Achromobacter xylosoxidans* F3B umożliwiła wzrost *A. thaliana* w obecności wzrastającego stężenia związków aromatycznych. Natomiast, zaszczepienie roślin endofitem *Burkholderia cepacia* FX2, poza przyrostem biomasy, bezpośrednio prowadziło także do obniżenia poziomu transpiracji toluenu, co było wynikiem biodegradacji tego związku przez endofity (Wang i wsp., 2010).

## II. Cel pracy

Celem badań było: (1) charakterystyka zespołów bakterii endofitycznych roślin porastających gleby długotrwale skażone związkami ropopochodnymi oraz (2) zastosowanie wybranych szczepów bakterii endofitycznych w procesie fitoremediacji wspomaganej.

Badania zostały podzielone na trzy etapy, odpowiadające kolejnym celom niniejszej pracy:

1. Izolacja i utworzenie kolekcji szczepów bakterii endofitycznych zdolnych do rozkładu surowej ropy naftowej oraz charakterystyka wybranych cech genotypowych i fenotypowych izolatów.
2. Charakterystyka zespołów bakterii endofitycznych roślin porastających gleby długotrwale skażone związkami ropopochodnymi.
3. Fitoremediacja gleby skażonej związkami ropopochodnymi z wykorzystaniem życicy trwałej (*Lolium perenne*) i wyselekcjonowanych szczepów bakterii endofitycznych: *Rhodococcus erythropolis* 5WK oraz *Rhizobium* sp. 10WK, przeprowadzona w warunkach laboratoryjnych.

### III. Materiały i metody

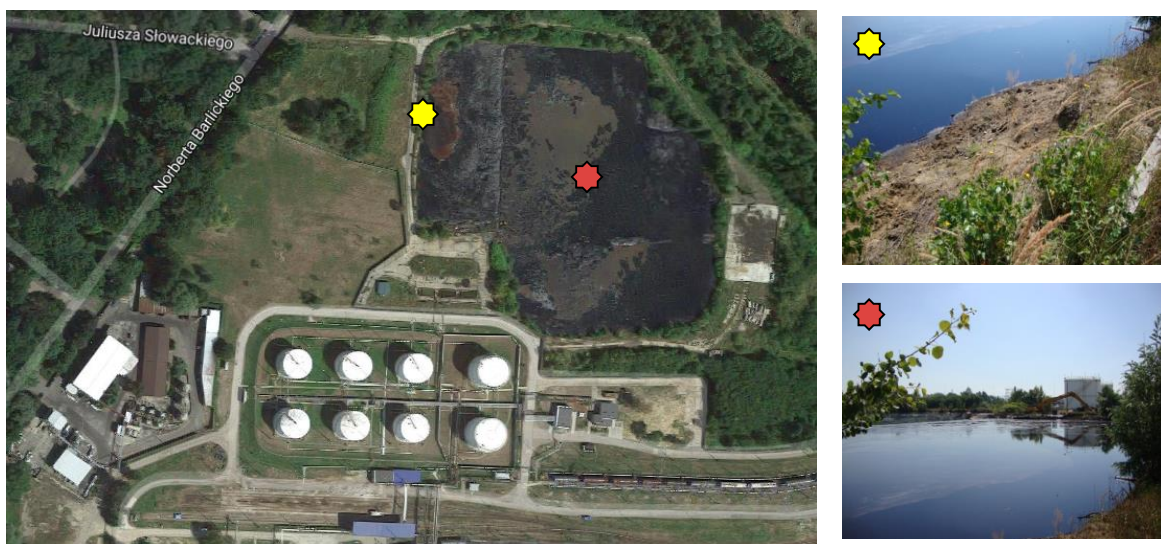
#### 3.1. Materiały

##### 3.1.1. Materiał roślinny

Do badań bioróżnorodności zespołów bakterii endofitycznych wybrano rośliny narażone na toksyczne działanie wysokich stężeń związków ropopochodnych, rosnące przy Rafinerii „Czechowice” S.A. w Czechowicach-Dziedzicach.

Obszar rafinerii jest silnie skażony związkami ropopochodnymi od 1971 roku, kiedy doszło do wybuchu zbiornika, w którym zmagazynowano 8850 ton ropy oraz zapalenia się rozlanej ropy w jego obwałowaniu. Ponadto, na terenie rafinerii od lat trzydziestych XX wieku składowane są niebezpieczne odpady w postaci kwaśnych smół porafinacyjnych w tak zwanych „dołach kwasowych” (Rys. 7).

Do badań wykorzystano rośliny takie jak: komonica zwyczajna (*Lotus corniculatus*), wiesiołek dwuletni (*Oenothera biennis*) oraz jastrzębiec wysoki (*Hieracium piloselloides*) zebrane wokół „dołów kwasowych” (49°54'49.0"N, 19°01'01.9"E).



Rys. 7. Teren przy Rafinerii „Czechowice” S.A. w Czechowicach-Dziedzicach. ⚡ Miejsce zebrania roślin; ⚡ „doły kwasowe”, (<https://maps.google.com>; zdjęcia własne).

### 3.1.2. Podłoża i odczynniki chemiczne

- Podłoże TSA (Tryptic Soy Agar): pepton K 15 g; pepton SK 5 g; NaCl 5 g; agar 15 g; woda demineralizowana 1000 ml.
- Podłoże minimalne M9:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3 g;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6 g; NaCl 0,5 g;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  1 g;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,24 g;  $\text{CaCl}_2$  0,01 g; woda demineralizowana 1000 ml.

Do podłoża M9 po sterylizacji dodawano substancje ropopochodne (surowa ropa naftowa, olej diesla lub *n*-heksadekan) oraz roztwory  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{CaCl}_2$  uprzednio wysterylizowane przez filtr strzykawkowy 0,22  $\mu\text{m}$ .

- Podłoże Pikovskaya: glukoza 5 g;  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  5 g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,5 g; NaCl 0,2 g;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,1 g; KCl 0,2 g; ekstrakt drożdżowy 0,5 g;  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  0,002 g;  $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,002 g; agar 15 g; woda demineralizowana 1000 ml.
- Podłoże CAS (Chrome Azurol S): Roztwór 1: 1 mM  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$  w 10 mM HCl 5 ml; wodny roztwór barwnika CAS (1,21 mg  $\text{ml}^{-1}$ ) 25 ml; wodny roztwór HDTMA (1,82 mg  $\text{ml}^{-1}$ ) 20 ml. Roztwór 2: PIPES 15,12 g;  $\text{K}_2\text{PO}_4$  0,15 g; NaCl 0,25 g;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,5 g; agar 10 g; woda demineralizowana 400 ml. Roztwór 3: glukoza 1 g; mannitol 1 g;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  246,5 mg;  $\text{CaCl}_2$  5,5 mg;  $\text{MnSO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$  0,508 mg;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,7 mg;  $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$  0,02 mg;  $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,6 mg;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 mg; woda demineralizowana 35 ml. Roztwór 4: hydrolizat kazeiny 1,5 g; woda demineralizowana 15 ml.

Roztwór 1 przygotowano z wykorzystaniem wcześniej wysterylizowanej wody demineralizowanej. Roztwór 2 i 3 sterylizowano w autoklawie w temp. 121°C przez 20 min. Po ich ochłodzeniu do temp. ok. 50-60°C roztwory mieszano i dodawano roztwór 4 uprzednio wysterylizowany przez filtr strzykawkowy 0,22  $\mu\text{m}$ .

- Podłoże LB (Luria Bertani): pepton kazeinowy (trypton) 10 g; ekstrakt drożdżowy 5 g; NaCl 10 g; woda demineralizowana 1000 ml.
- Podłoże bulion odżywczy z glicyną: ekstrakt mięsny 3 g; pepton 5 g; glicyna 4,4 g; woda demineralizowana 1000 ml.
- Podłoże PDA (Potato Dextrose Agar): ziemniaczanka 200 g; dekstroza 20 g; agar 15 g; woda demineralizowana 1000 ml.
- Podłoże z karboksymetylocelulozą (CMC, ang. carboxymethylcellulose agar): karboksymetyloceluloza 10 g;  $\text{FeCl}_3$  0,004 g;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1 g; NaCl 0,6 g;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,5 g;  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,5 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,5 g;  $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$  0,002 g; ekstrakt drożdżowy 0,1 g; agar 15 g; woda demineralizowana 1000 ml.

- Odczynnik Salkowskiego: 150 ml stężonego kwasu siarkowego (VI) ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ); 250 ml wody destylowanej; 7,5 ml 0,5 M  $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ .
- Bufor ekstrakcyjny: C-TAB 2 g; Tris HCl pH=8,1 1 M 10 ml; EDTA 0,5 M 4 ml; NaCl 5 M 28 ml;  $\beta$ -merkaptotoetanol 1 ml.

## 3.2. Metody

### 3.2.1. Izolacja bakterii endofitycznych zdolnych do rozkładu surowej ropy naftowej

Bakterie endofityczne izolowano z korzeni, łodyg i liści komonicy zwyczajnej, wiesiołka dwuletniego oraz jastrzębca wysokiego. Korzenie oczyszczano z przyległej gleby, cięto na fragmenty o długości 1-2 cm, następnie wytrząsano przez 15 min w 1% roztworze Tween 80. Powierzchniową sterylizację korzeni przeprowadzano zanurzając fragmenty tkanki na 2 min kolejno w 0,01% roztworze podchlorynu sodu, 10%  $\text{H}_2\text{O}_2$  i 70% etanolu, a następnie trzykrotnie płukano w sterylnej wodzie destylowanej. Łodygi i liście sterylizowano przez 1-2 min w 10%  $\text{H}_2\text{O}_2$  i 70% etanolu, a następnie trzykrotnie płukano w sterylnej wodzie destylowanej. Każdy proces powierzchniowej sterylizacji był kontrolowany przez posiew 200  $\mu\text{l}$  wody z ostatniego płukania na płytki z podłożem TSA, które inkubowano w temp. 28°C przez 7 dni. Brak kolonii bakterii i grzybów na podłożu świadczył o poprawnym przeprowadzeniu procesu powierzchniowej sterylizacji. Tak przygotowany materiał roślinny wykorzystano w kolejnych etapach doświadczenia.

Wysterylizowaną tkankę roślinną rozcierano w sterylnym moździerzu zawierającym 9 ml sterylnej soli fizjologicznej. Otrzymany homogenat przenoszono na podłoże minimalne M9 zawierające surową ropę naftową stanowiącą jedyne źródło węgla i energii, której końcowe stężenie wynosiło 1% lub 2%. Po 7 dniach inkubacji w temp. 28°C, różniące się morfologicznie kolonie bakterii, przesiewano metodą posiewu redukcyjnego na podłoże M9 z surową ropą naftową w stężeniu 1%. Uzyskane czyste kultury bakterii przechowywano w stanie zamrożenia z dodatkiem 15% glicerolu w temp. -20°C.

### 3.2.2. Wykorzystanie węglowodorów jako jedyne źródła węgla i energii

Ocenę zdolności izolatów do wzrostu w obecności oleju diesla, *n*-heksadekanu lub *p*-ksylenu i ich potencjalnego rozkładu przeprowadzono na podłożu M9, w którym węglowodory (końcowe stężenie 1%), stanowiły jedyne źródło węgla. Hodowle szczepów, w trzech powtórzeniach, prowadzono przez 7 dni w temp. 28°C z wytrząsaniem



(120 obr  $\text{min}^{-1}$ ). O zdolności do wzrostu w obecności węglowodoru i wykorzystania go jako źródła węgla świadczył przyrost gęstości optycznej (OD, ang. optical density) hodowli w podłożu M9. Pomiar OD prowadzono na spektrofotometrze GENESYS<sup>TM</sup> 20 (Thermo Scientific).

### 3.2.3. Charakterystyka genotypowych cech bakterii endofitycznych

#### 3.2.3.1. Określenie przynależności gatunkowej wyizolowanych szczepów

Analiza restrykcyjna zamplifikowanych fragmentów rybosomalnego DNA (ARDRA, ang. amplified ribosomal DNA restriction analysis) pozwoliła na wyodrębnienie reprezentatywnych szczepów bakterii spośród wszystkich izolatów. Następnie, wybrane szczepy oznaczano do gatunku poprzez sekwencjonowanie fragmentu genu 16S rRNA.

Izolację genomowego DNA bakterii endofitycznych przeprowadzano zgodnie z instrukcją producenta wykorzystując zestaw DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen). Na matrycy bakteryjnego DNA amplifikowano fragment genu 16S rRNA z wykorzystaniem uniwersalnych starterów: 27F (5' GAG TTT GAT CCT GGC TCA G 3') oraz 1492R (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T 3'). Mieszanina reakcyjna PCR o objętości 50  $\mu\text{l}$  składała się z: 1  $\mu\text{l}$  matrycowego DNA, 5  $\mu\text{l}$  10 $\times$ stężonego buforu High Fidelity PCR (Invitrogen), 2  $\mu\text{l}$  50 mM  $\text{MgSO}_4$ , 1  $\mu\text{l}$  10 mM dNTP mix, po 1  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{M}$  starterów 27F i 1492R, 0,2  $\mu\text{l}$  polimerazy Platinum Taq High Fidelity (5 U) (Invitrogen), 38,8  $\mu\text{l}$  sterylnej wody demineralizowanej. Reakcję PCR przeprowadzono w termocyklerze C1000 Touch<sup>TM</sup> Thermal Cycler (BioRad) według następującego profilu temperaturowego: (1) wstępna denaturacja 5 min 95°C, (2) 35 cykli: denaturacji 1 min 94°C, przyłączania starterów 30 s 52°C, elongacji 3 min 72°C, (3) końcowa elongacja 10 min 72°C. Analizę elektroforetyczną otrzymanych produktów PCR przeprowadzano w 2% żelach agarozowych (60 min, 100 V), które wybarwiano Gel Red (VWR, Leuven, Belgia).

Następnie, stosowano metodę ARDRA z wykorzystaniem rzadko tnącego enzymu restrykcyjnego HpYCH4IV, rozpoznającego czteronukleotydową sekwencję (5' A/CGT 3'). Mieszanina restrykcyjna zawierała: 2,9  $\mu\text{l}$  10 $\times$ stężonego buforu CutSmart (New England Biolabs), 0,3  $\mu\text{l}$  enzymu HpyCH4IV (New England Biolabs), 1,1  $\mu\text{l}$  RNazy, 4,3  $\mu\text{l}$  sterylnej wody demineralizowanej, 20  $\mu\text{l}$  produktu amplifikacji genu 16S rRNA. Całość inkubowano 2 godz. w temp. 37°C. Inaktywację enzymu restrykcyjnego przeprowadzano w temp. 65°C przez 20 min. Uzyskane po trawieniu restrykcyjnym fragmenty DNA, o różnej długości, rozdzielano za pomocą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym (130 min, 110 V) barwionym

Gel Red. Charakterystyczne układy prążków otrzymane dla każdego z badanych amplikonów, analizowano, porównywano i klasyfikowano w grupy ARDRA o tym samym wzorze. W ten sposób wybrano 26 produktów PCR reprezentatywnych dla różnych klas ARDRA, które wysłano do sekwencjonowania firmie Macrogen (Amsterdam, Holandia). Uzyskane sekwencje fragmentu genu 16S rRNA analizowano i porównywano metodą Clustal W względem szczepów referencyjnych dostępnych w bazie danych National Center for Biotechnology Information Database (NCBI), wykorzystując Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Drzewo filogenetyczne pokrewieństwa skonstruowano przy użyciu metody najbliższego sąsiedztwa (Neighbour-Joining) korzystając z programu MEGA 7.0. Wartości bootstrap wyliczono dla 1000 powtórzeń. Sekwencje fragmentu genu 16S rRNA wybranych szczepów zostały umieszczone w bazie NCBI GenBank pod numerami od KU726257 do KU726272 oraz MF765329 do MF765338.

### 3.2.3.2. Detekcja genów kodujących enzymy zaangażowane w rozkład węglowodorów

U wyizolowanych szczepów bakterii endofitycznych metodą PCR sprawdzano obecność genów kodujących monooksygenazę alkanową (*alkB*), hydroksylazę alkanową (*alkH*), grupę enzymów spokrewnionych z cytochromem P450 (rodzina CYP153) (*P450*), dioksygenazę-2,3-katecholu (*C23O*) oraz podjednostkę alfa dioksygenaz hydroksylujących wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (*pah*).

Izolację genomowego DNA bakterii przeprowadzano zgodnie z protokołem zestawu GeneMatrix Bacterial&Yeast Genomic DNA Purification Kit (EURx DNA Gdańsk). Amplifikację fragmentów genów kodujących enzymy zaangażowane w rozkład węglowodorów alifatycznych i aromatycznych przeprowadzano wykorzystując startery wymienione w Tabeli 1. Mieszanina reakcyjna (25 µl) zawierała: 1 µl matrycowego DNA, 2,5 µl 10×stężonego buforu Dream Taq (Thermo Scientific), 1 µl każdego ze starterów danej pary w stężeniu 10 mM, 0,2 µl polimerazy Dream Taq DNA (5 U) (Thermo Scientific), 19,3 µl sterylnej wody demineralizowanej. Warunki reakcji PCR były następujące: (1) wstępna denaturacja 5 min 95°C, (2) 30 cykli: denaturacji 1 min 95°C, przyłączania starterów w temp. jak w Tabeli 1, elongacji 1 min 72°C, (3) końcowa elongacja 5 min 72°C. Produkty reakcji rozdzielano w 2% żelu agarozowym (60 min, 100 V).

### 3.2.3.3. Detekcja genu *acdS*

Potencjalną zdolność bakterii endofitycznych do syntezy enzymu deaminazy ACC oceniano na podstawie wyników reakcji PCR. W tym celu stosowano pary zdegenerowanych starterów specyficznych dla sekwencji nukleotydowej kodującej enzym deaminazę ACC (*acdS*) (Tabela 1).

Izolację genomowego DNA bakterii, reakcję PCR i weryfikację specyficzności produktów PCR przeprowadzano według tych samych procedur, które stosowano w badaniach genów kodujących enzymy zaangażowane w rozkład węglowodorów alifatycznych i aromatycznych przedstawionych w rozdziale 3.2.3.2. Sekwencje starterów i temperaturę ich przyłączania podano w Tabeli 1.

Tabela 1. Startery wykorzystane w reakcjach amplifikacji fragmentów genów kodujących enzymy uczestniczące w rozkładzie węglowodorów alifatycznych i aromatycznych (*alkH*, *alkB*, *C23O*, *P450*, *pah*) oraz genu kodującego enzym deaminazę ACC (*acdS*).

Nazwa genu	Sekwencje starterów (5'→3')	Długość produktu PCR (pz)	Temperatura przyłączania starterów (°C)	Źródło
<u><i>alkH</i></u> alk-H1-F  alk-H3-R	CIG IIC ACG AII TIG GIC ACA AGA AGG IGC ITG ITG ATC III GTG ICG CTG IAG	549	60	Phillips i wsp., 2008
<u><i>alkB</i></u> alkB-F alkB-R	AAC TAC MTC GAR CAY TAC GG TGA MGA TGT GGT YRC TGT TCC	100	49	Powell i wsp., 2006
<u><i>C23O</i></u> C23O-F  C23O-R	AGG TGC TCG GTT TCT ACC TGG CCG A ACG GTC ATG AAT CGT TCG TTG AG	406	65	Phillips i wsp., 2008
<u><i>P450</i></u> P450fw1 P450rv3	GTS GGC GGC AAC GAC ACS AC GCA SCG GTG GAT GCC GAA GCC RA	339	58	Yousaf i wsp., 2010a,b
<u><i>pah</i></u> PAH-RHDα GP F	CGG CGC CGA CAA YTT YGT NGG	292	54	Cebtron i wsp., 2008

PAH-RHD $\alpha$ GP R	GGG GAA CAC GGT GCC RTG DAT RAA			
<i>acdS</i> F1936 F	GHG AMG ACT GCA AYW SYG GC	F1936/ F1938-792		
F1938 R	ATC ATV CCV TGC ATB GAY TT	F1936/ F1939-558	50	Blaha i wsp., 2006
F1939 R	GAR GCR TCG AYW CCR ATC AC			

### 3.2.3.4. Analiza elektroforetyczna

Produkty reakcji PCR rozdzielano w żelach agarozowych o różnym stężeniu agarozы dostosowanym względem spodziewanej wielkości produktu amplifikacji. Próbkę DNA nakładano do studzienek po uprzednim obciążeniu barwnikiem firmy Thermo Scientific. Wykorzystywano następujące markery wielkości: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder oraz GeneRuler™ Express DNA Ladder. Rozdział elektroforetyczny DNA przeprowadzano w aparatach Mini-Sub® Cell GT Cell, Wide Mini-Sub Cell GT Cell, Sub-Cell® GT Cell (Bio-Rad). DNA wizualizowano w transilluminatorze Gel Doc™ XR+ (Bio-Rad), a wyniki dokumentowano za pomocą programu Image Lab.

## 3.2.4. Biochemiczna charakterystyka bakterii endofitycznych

### 3.2.4.1. Rozpuszczanie fosforanów

Zdolność wyizolowanych bakterii endofitycznych do rozpuszczania fosforanów sprawdzano w trzech powtórzeniach na podłożu Pikovskaya. Na pożywce wykonywano posiew punktowy bakterii za pomocą sterylnej igły bakteriologicznej. Po 14 dniach inkubacji w temp. 28°C mierzono średnicę kolonii bakterii oraz stref przejaśnień, które powstały w wyniku uwolnienia fosforu z jego nierozpuszczalnej soli Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (Pikovskaya, 1948).

### 3.2.4.2. Wytwarzanie kwasu indolilo-3-octowego (IAA)

Ilość wytwarzanego IAA przez bakterie endofityczne oznaczano za pomocą metody spektrofotometrycznej. W tym celu bakterie hodowano na podłożu płynnym LB zawierającym tryptofan w stężeniu 500 µg ml<sup>-1</sup>. Po 4 dniach inkubacji w temp. 28°C 2 ml hodowli odwirowywano (10 000 obr min<sup>-1</sup>, 10 min), a otrzymany supernatant mieszało ze 100 µl 10 mM kwasu ortofosforowego oraz 4 ml odczynnika Salkowskiego. Tak przygotowane próby inkubowano w ciemności przez 25 min w temperaturze pokojowej. Metodą spektrofotometryczną mierzono absorbancję mieszanin przy długości fali 530 nm.

Stężenie powstałego IAA, o czym świadczyło pojawianie się różowego zabarwienia, wyliczano z krzywej wzorcowej sporządzonej w zakresie 1-100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  tego związku (Gordon i Weber, 1951).

#### 3.2.4.3. Wytwarzanie cyjanowodoru (HCN)

W celu zbadania zdolności bakterii endofitycznych do wytwarzania HCN izolaty te hodowano przez 4 dni w temp. 28°C z wytrząsaniem (120 obr  $\text{min}^{-1}$ ) na podłożu bulion odżywczy z glicyną, której końcowe stężenie wynosiło 4,4 mg  $\text{l}^{-1}$ . Po tym czasie, hodowlę bakterii wysiewano na to samo podłoże zestalone agarem. Kwadraty (o boku 2 cm) sterylnej bibuły, nasączone roztworem 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  w 0,5% roztworze kwasu pikrynowego, наносono na środek każdej płytki Petriego, którą uszczelniano parafilmem i inkubowano 4 dni w temp. 28°C (Lorck, 1948). Zmiana zabarwienia bibuły z żółtej na pomarańczową i/lub brązową, świadczyła o zdolności bakterii do wytwarzania HCN.

#### 3.2.4.4. Produkcja sideroforów

Ocenę zdolności bakterii endofitycznych do produkcji sideroforów przeprowadzano wykorzystując zmodyfikowaną metodę Schwyn i Neilands (1987). Na podłożu CAS, zawierającym barwnik Chrome Azurol S, wykonywano posiew redukcyjny szczepów, a płytki inkubowano przez 4 dni w temp. 28°C. Pod wpływem wydzielanych przez bakterie sideroforów katecholowych, podłoże CAS zmieniło barwę na fioletową, a w przypadku wydzielania sideroforów hydroksamowych, stawało się żółtopomarańczowe.

#### 3.2.4.5. Hamowanie wzrostu fitopatogennych grzybów

Ocena zdolności bakterii endofitycznych do hamowania wzrostu fitopatogennych grzybów została przeprowadzona na podłożu PDA (ang. Potato Dextrose Agar). Jako szczepy referencyjne zastosowano *Cladosporium sphaerospermum* KKP741, *Fusarium avenaceum* KKP756, *Fusarium graminearum* KKP1771, pozyskane z kolekcji Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu.

Grzyby mikroskopowe hodowano na podłożu PDA przez 7 dni w temp. 23°C. Następnie, wycinano kwadrat podłoża wraz z grzybnią o boku 1-2 cm, który przenoszono na środek nowej płytki Petriego z podłożem PDA. W odległości około 3-4 cm od grzybni wykonywano posiew rysowy 24 godzinnej hodowli bakterii. Płytki kontrolne przygotowywano w ten sam sposób, bez wykonywania posiewów badanych szczepów

bakterii. Całość inkubowano przez 7-14 dni w temp. 23°C do momentu uzyskania na płytkach kontrolnych odpowiedniego wzrostu grzybni (przekroczenie promienia 3-4 cm). Widoczne strefy zahamowania wzrostu grzybni potwierdzały właściwości przeciwwgrzybowe bakterii endofitycznych.

#### **3.2.4.6. Produkcja enzymów celulolitycznych**

Zdolność do produkcji enzymów celulolitycznych przez bakterie endofityczne sprawdzano na podłożu z karboksymetylocelulozą (CMC, ang. carboxymethylcellulose agar). Metodą punktową posiewano każdy szczep bakterii na jednej płytce Petriego z podłożem CMC w trzech powtórzeniach. Po 14 dniach inkubacji w temp. 28°C powierzchnię podłoża zalewano płynem Lugola na 15 min. Następnie płyn zlewano, a średnice powstałych przejaśnień wokół kolonii mierzono (Pointing, 1999).

#### **3.2.4.7. Zdolność do ruchu**

Zdolność bakterii endofitycznych do ruchu sprawdzano na podłożu bulion odżywczy zestalonym agarem, którego końcowe stężenie wynosiło 0,2%. Posiewy bakterii wykonywano metodą punktową na środku płytki Petriego z podłożem. Po 24-48 godz. inkubacji w temp. 28°C oceniano stopień rozprzestrzeniania się bakterii na powierzchni podłoża. Wzrost bakterii na całej lub w przeważającej części pożywki wskazywał na zdolności izolatów do ruchu.

#### **3.2.4.8. Biosynteza biosurfaktantów/bioemulsyfikatorów**

Ocenę zdolności izolatów do biosyntezy biosurfaktantów/bioemulsyfikatorów, przeprowadzano wyznaczając indeks emulsyfikacji (E24). Bakterie hodowano na płynnych podłożach LB, M9 z surową ropą naftową w stężeniu 1% oraz M9 z *n*-heksadekanem w stężeniu 1%, przez 7 dni w temp. 28°C z wytrząsaniem (120 obr min<sup>-1</sup>). Po tym czasie odwirowywano 2 ml hodowli, a otrzymany supernatant worteksowano przez 2 min z 3 ml oleju diesla, *n*-heksadekanu lub *p*-ksylenu. Tak przygotowane próby inkubowano w temperaturze pokojowej przez 24 godz., a następnie mierzono całkowitą wysokość roztworów w probówce oraz wysokość powstałej warstwy emulsji (Pacwa-Płociniczak i wsp., 2014). Indeks emulsyfikacji (E24) obliczano ze wzoru:

$$E24 = \frac{a}{b} * 100\%$$

gdzie: a–wysokość warstwy emulsji [mm]; b–całkowita wysokość roztworu [mm]

### 3.2.5. Pirosekwencjonowanie 454

Bioróżnorodność bakterii endofitycznych w tkankach komonicy zwyczajnej oraz jastrzębica wysokiego analizowano wykorzystując pirosekwencjonowanie 454. W sumie analizie poddano 5 prób (w czterech powtórzeniach) oznaczonych odpowiednio: KK (Komonica korzeń), KŁ (Komonica łodyga), KL (Komonica liść), JK (Jastrzębiec korzeń), JL (Jastrzębiec liść).

#### 3.2.5.1. Izolacja DNA z roślin

Izolację DNA z tkanek roślin przeprowadzano według zmodyfikowanej metody mikro C-TAB. Świeżo zebrane rośliny oczyszczano i sterylizowano tak, jak opisano w rozdziale 3.2.1. Do dalszych etapów izolacji DNA wykorzystywano tylko sterylny materiał roślinny.

Materiał roślinny (0,03-0,15 g) rozcierano w moździerzu z solą fizjologiczną. Dodawano 1 ml podgrzanego do temp. 60°C buforu ekstrakcyjnego, a następnie w tej samej temperaturze inkubowano próby delikatnie je mieszając. Po 30 min do prób dodawano 800 µl roztworu chloroform-alkohol izoamylowy (24:1), całość odwirowywano (10 000 obr min<sup>-1</sup>, 4°C, 20 min), uzyskaną fazę wodną (górną) przenoszono do nowej probówki i ponownie dodawano 600 µl roztworu chloroform-izoamylowy alkohol. Po ponownym wirowaniu (10 000 obr min<sup>-1</sup>, 4°C, 10 min), fazę wodną (górną) przenoszono do nowej probówki i dodawano 1 ml 96% etanolu, w celu wytrącenia kwasów nukleinowych. Po kolejnym wirowaniu (10 000 obr min<sup>-1</sup>, 4°C, 30 min) osad przemywano 1 ml 70% etanolu i wirowano (10 000 obr min<sup>-1</sup>, 4°C, 5 min). Po wysuszeniu osadu w temperaturze pokojowej zawieszano go w 100 µl buforu TE. W celu usunięcia RNA, do prób dodawano 1 µl RNAzy (10 mg ml<sup>-1</sup>) i inkubowano w łaźni wodnej w temp. 37°C przez 45 min. W ten sposób uzyskany z tkanek roślinnych DNA przechowywano w temp. -20°C.

#### 3.2.5.2. PCR

W celu przygotowania prób do pirosekwencjonowania 454 przeprowadzono dwie reakcje PCR. Wyizolowany z tkanek roślinnych i oczyszczony DNA był matrycą w pierwszej

z nich, gdzie zastosowano startery 799F (5' AAC MGG ATT AGA TAC CCK G 3') i 1193R (5' ACG TCA TCC CCA CCT TCC 3') flankujące region hiperzmienny V5-V7 genu 16S rRNA (Beckers i wsp., 2017). Startery te wybrano aby uniknąć namnażania produktu na matrycy mitochondrialnego bądź chloroplastowego DNA. Uzyskany produkt amplifikacji wielkości 394 pz wycinano z 1,5% żelu agarozowego i oczyszczono za pomocą zestawu do ekstrakcji z żelu QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). W drugiej reakcji PCR zastosowano zmodyfikowane startery 799F/1193R przedłużone o specyficzną dla każdej próby sekwencję nukleotydów (MID) o długości 10 pz mającą na celu identyfikację danej próby podczas pirosekwencjonowania. Matrycą był produkt amplifikacji pierwszej reakcji PCR. Mieszanina reakcyjna obu reakcji składała się z 1-6 µl matrycowego DNA (w zależności od stężenia DNA w badanej próbce), 5 µl buforu 10×High Fidelity (Invitrogen), 2 µl 50 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 µl 10 mM dNTP mix, 1 µl starterów 799F i 1193R w stężeniu 10 µM, 0,2 µl polimerazy Platinum Taq High Fidelity (5 U) (Invitrogen), 33,8-38,8 µl sterylnej wody demineralizowanej. Warunki przeprowadzonej reakcji PCR uwzględniały: (1) początkową denaturację 95°C 5 min, następnie (2) 35 cykli obejmujących 94°C 1 min, 53°C 40 s i 72°C 40 s, (3) końcową elongację 7 min 72°C (Techne<sup>TC</sup> 5000 PCR Thermal Cycler). Otrzymane produkty drugiej reakcji PCR, czyli amplikony znakowane MID, oczyszczano za pomocą zestawu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Stężenie DNA w każdej próbce określano fluorymetrycznie w obecności barwnika PicoGreen dsDNA Quantitation assay (Life Technologies) przy użyciu czytnika płytek Fluostar Omega (BMG Labtech). Równomolowe stężenia amplikonów, znakowanych odpowiednimi adaptorami MID, łączono ze sobą i wysłano do Macrogen (Amsterdam, Holandia), gdzie przeprowadzono pirosekwencjonowanie na aparacie 454 Genom Sequencer FLX Titanium.

### 3.2.5.3. Analiza wyników pirosekwencjonowania 454

Surowe sekwencje, tzw. raw data, analizowano z wykorzystaniem programu QIIME 1.9.1 (ang. quantitative insights into microbial ecology) (Caporaso i wsp., 2010a). Następnie, sekwencje złej jakości usuwano stosując AmpliconNoise (Quince i wsp., 2009). Otrzymane biblioteki rozdzielano według sekwencji MID, które następnie usuwano, tak jak sekwencje starterów, homopolimerów dłuższych niż 6 pz i sekwencji krótszych niż 200 pz. Powstałe chimery identyfikowano i usuwano przy wykorzystaniu UCHIME 4.2.40 (Edgar i wsp., 2011) zgodnie z algorytmem USEARCH61 (Edgar, 2010). Tak wyselekcjonowane sekwencje uporządkowano zgodnie ze strategią 'open reference'. Z uzyskanych sekwencji usuwano



również te należące do genomów mitochondrialnych, chloroplastowych i *Archaea*. W ten sposób zanalizowane sekwencje ostatecznie przetwarzano przez PyNast 0.1 (Caporaso i wsp., 2010b). Grupowanie OTU (ang. operational taxonomic unit, operacyjna jednostka taksonomiczna) przeprowadzano na poziomie 97% podobieństwa sekwencji DNA, następnie wszystkie OTU przydzielano do odpowiednich jednostek taksonomicznych w oparciu o bazę GreenGenes (DeSantis i wsp., 2006).

Krzywe rarefakcji (rozrzedzenia) wykreślano dla każdej z analizowanych prób. Do oceny zmienności i bioróżnorodności zespołów bakterii endofitycznych badanych roślin wykorzystano: liczbę obserwowanych gatunków, różnorodność filogenetyczną, indeks Shannona ( $H'$ ) (wskaźnik ogólnej bioróżnorodności), wskaźnik różnorodności Simpsona ( $1/D$ ) (wskaźnik bogactwa gatunkowego, charakteryzujący różnorodność gatunkową), estymator asymptotycznego bogactwa gatunkowego Chao1 oraz indeks Gooda (Good's coverage) (metoda szacowania, jaki procent wszystkich gatunków jest reprezentowany w badanej próbie).

Analizę głównych współrzędnych PCoA (ang. principal coordinate analysis) przeprowadzono wykorzystując metrykę UniFrac (Unweighted i Weighted) opierającej się na informacji filogenetycznej (Lozupone i Knight, 2007). Pozwala ona na odrzucenie czynników najmniej istotnych i wyróżnienie czynników kluczowych. W analizie bioróżnorodności bakterii endofitycznych badanych roślin, metodę PCoA wykorzystano do wyznaczania korelacji pomiędzy próbami, a także określania wzorców zmienności.

### **3.2.6. Doświadczenie fitoremediacyjne**

#### **3.2.6.1. Gleba**

W doświadczeniu fitoremediacyjnym wykorzystano glebę pobraną w pobliżu „dołów kwasowych” przy rafinerii w Czechowicach-Dziedzicach. Glebę pobierano z powierzchniowej warstwy o głębokości 0-20 cm, a następnie przechowywano w chłodni w temp. 4°C. Przed rozpoczęciem doświadczenia przesiewano ją przez sita, z których ostatnie miały oczka o średnicy 2 mm.

W doświadczeniu fitoremediacyjnym stosowano szczepy bakterii odporne na rifampicynę. Dlatego, konieczne było sprawdzenie czy wśród mikroorganizmów autochtonicznych gleby wykorzystanej w doświadczeniu fitoremediacyjnym nie występują szczepy odporne na ten antybiotyk. W tym celu wykonywano posiewy gleby na podłoże LB

z rifampicyną w stężeniu 20-150  $\mu\text{g ml}^{-1}$  oraz nystatyną w stężeniu 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Testy te były ujemne, nie notowano wzrostu kolonii bakterii.

### 3.2.6.2. Szczepy bakterii endofitycznych

Na podstawie przeprowadzonych analiz genetycznych i biochemicznych, do doświadczenia fitoremediacyjnego, wybrano dwa szczepy bakterii endofitycznych: *Rhodococcus erythropolis* 5WK oraz *Rhizobium* sp. 10WK. W celu monitorowania ich przeżywalności w glebie i tkankach żywicy trwałej (*Lolium perenne*) podczas doświadczenia, wyselekcjonowano dzikie mutanty tych szczepów odporne na rifampicynę: *R. erythropolis* 5WK<sup>rif</sup> oraz *Rhizobium* sp. 10WK<sup>rif</sup>.

Selekcję spontanicznych mutantów obu endofitów przeprowadzano wykonując posiew redukcyjny szczepów na podłożu LB zawierającym rifampicynę w stężeniu 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Następnie, wyrosłe kolonie kolejno przenoszono na podłoże LB ze wzrastającym stężeniem rifampicyny od 20-150  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Uzyskane w ten sposób *R. erythropolis* 5WK<sup>rif</sup> oraz *Rhizobium* sp. 10WK<sup>rif</sup>, odporne na najwyższe stężenie antybiotyku, wielokrotnie hodowano na podłożu LB bez rifampicyny, a następnie posiewano ponownie na podłoże LB z rifampicyną w stężeniu 150  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Dzięki temu, potwierdzono trwałość uzyskanej wcześniej oporności. Dzikie mutanty odporne na rifampicynę 5WK<sup>rif</sup> oraz 10WK<sup>rif</sup>, tak jak szczepy rodzicielskie, posiadały te same mechanizmy promujące wzrost roślin oraz potencjał degradacji węglowodorów, co potwierdzano wykonując odpowiednie testy opisane w rozdziałach 3.2.2., 3.2.3., 3.2.4.

### 3.2.6.3. Inokulum

Inokulum bakteryjne przygotowywano wykorzystując rifampicynooporne szczepy: *R. erythropolis* 5WK<sup>rif</sup> oraz *Rhizobium* sp. 10WK<sup>rif</sup>. Bakterie hodowano na podłożu LB z rifampicyną w stężeniu 150  $\mu\text{g ml}^{-1}$  w temp. 28°C, z wytrząsaniem (120 obr min<sup>-1</sup>) przez 14-16 godz., aż do uzyskania właściwej absorbancji ( $\text{OD}_{600\text{nm}}=1,5-2,0$ ). Uzyskane hodowle odwirowywano (5000 obr min<sup>-1</sup>, 20°C, 15 min), otrzymany osad przemywano trzy razy sterylnym roztworem 0,9% NaCl, a następnie zawieszano w sterylnym roztworze 0,9% NaCl. Za pomocą pomiarów gęstości optycznej i posiewów płytkowych oceniano liczebność bakterii w 1 ml hodowli, jednocześnie dobierając jej objętość tak, aby liczba wprowadzonych bakterii do gleby wynosiła 10<sup>8</sup> j.t.k. g<sup>-1</sup> suchej masy gleby (s.m. gleby). Bakterie endofityczne

wprowadzano do gleby w postaci inokulum, które składało się z pojedynczych szczepów 5WK<sup>rif</sup> lub 10WK<sup>rif</sup> lub konsorcjum obu szczepów.

#### 3.2.6.4. Doświadczenie fitoremediacyjne

Do doświadczenia fitoremediacyjnego wybrano życicę trwałą ze względu na udokumentowane w literaturze przedmiotu jej zdolności do wzrostu w glebie skażonej substancjami ropopochodnymi.

Doświadczenie fitoremediacyjne prowadzono w następujących układach doświadczalnych:

- (1) zanieczyszczona gleba (**S**)
- (2) zanieczyszczona gleba z wysianymi nasionami życicy (**R**)
- (3) zanieczyszczona gleba z wysianymi nasionami życicy inokulowana szczepem 5WK<sup>rif</sup> (**SI+5WK**)
- (4) zanieczyszczona gleba z wysianymi nasionami życicy inokulowana szczepem 10WK<sup>rif</sup> (**SI+10WK**)
- (5) zanieczyszczona gleba z wysianymi nasionami życicy inokulowana konsorcjum szczepów 5WK<sup>rif</sup> i 10WK<sup>rif</sup> (**SI+5WK+10WK**)
- (6) zanieczyszczona gleba z wysianymi nasionami życicy pre-inokulowanymi szczepem 5WK<sup>rif</sup>, a następnie inokulowana gleba szczepem 5WK<sup>rif</sup> (**PI+5WK**)
- (7) zanieczyszczona gleba z wysianymi nasionami życicy pre-inokulowanymi szczepem 10WK<sup>rif</sup>, a następnie inokulowana gleba szczepem 10WK<sup>rif</sup> (**PI+10 WK**)
- (8) zanieczyszczona gleba z wysianymi nasionami życicy pre-inokulowanymi konsorcjum szczepów 5WK<sup>rif</sup> i 10WK<sup>rif</sup>, a następnie inokulowana gleba konsorcjum szczepów 5WK<sup>rif</sup> i 10WK<sup>rif</sup> (**PI+5WK+10WK**)

W doniczkach (550 ml) umieszczano przygotowaną wcześniej glebę (450 g), do której wysiewano nasiona życicy (0,40±0,1 g). W trakcie doświadczenia wilgotność gleby utrzymywano na stałym poziomie (20%), poprzez podlewanie jej co 2-3 dni odpowiednią ilością wody wodociągowej. Doniczki umieszczono w pokoju hodowlanym w warunkach 14 godz. dnia o temp. 23°C i 10 godz. nocy z temp. 18°C.

W przeprowadzonym doświadczeniu fitoremediacyjnym stosowano dwie metody inokulacji: (1) inokulację gleby (SI); (2) pre-inokulację nasion z inokulacją gleby (PI). W pierwszej metodzie (SI), po wysianiu nasion (0,40±0,1 g) do gleby, równomiernie na całą

powierzchnię, wprowadzano 40 ml inokulum zawierającego pojedyncze szczepy (5WK<sup>rif</sup> lub 10WK<sup>rif</sup>) lub konsorcjum obu szczepów. W drugiej metodzie (PI), zastosowano najpierw wstępną bakteryjną inokulację nasion życicy tzw. pre-inokulację. Przed pre-inokulacją, nasiona powierzchniowo sterylizowano, płuczając je przez 5 min kolejno w: 70% etanolu, 0,01% roztworze podchlorynu sodu i trzy razy w sterylnej wodzie. Skuteczność procesu sterylizacji weryfikowano przez posiew wody z ostatniego płukania na podłoże LB. Brak wzrostu kolonii bakterii świadczył o sterylnej powierzchni nasion. Tak przygotowane nasiona inkubowano w ciemności, bez wytrząsania w temp. 28°C z 14 ml zawiesiny bakteryjnej ( $10^8$  komórek ml<sup>-1</sup> podłoża), zawierającej szczep 5WK<sup>rif</sup>, 10WK<sup>rif</sup> lub konsorcjum obu szczepów zmieszanych w stosunku 1:1. Po 24 godz. nasiona przemywano trzy razy sterylną wodą i wysiewano je do doniczek. Następnie, w okolice nasion wprowadzano 40 ml świeżego, bakteryjnego inokulum zawierającego pojedyncze szczepy (5WK<sup>rif</sup> lub 10WK<sup>rif</sup>) lub konsorcjum obu szczepów.

W 14, 31 i 75 dniu prowadzenia doświadczenia określano świeżą masę roślin i pobierano próbki gleby. Do czasu przeprowadzenia analiz przechowywano je w temp. -20°C.

### **3.2.6.5. Oznaczenie zawartości TPH w glebie**

W celu oceny zawartości TPH w glebie przed rozpoczęciem doświadczenia, w 14, 31 i 75 dniu fitoremediacji, oznaczano zawartość węglowodorów zawierających od dziesięciu do czterdziestu atomów węgla w cząsteczce (C10-C40), metodą chromatografii gazowej według normy PN-EN ISO 16703.

### **3.2.6.6. Ocena przeżywalności wprowadzonych bakterii endofitycznych**

W celu oceny przeżywalności bakterii endofitycznych w glebie odważano 10 g gleby, którą zawieszano w 90 ml 0,9% NaCl z 1% Tween 80 i wytrząsano (120 obr min<sup>-1</sup>, 28°C, 30 min). Z wybranych rozcieńczeń wykonywano posiew na stałe podłoże LB z rifampicyną w stężeniu 150 µg ml<sup>-1</sup> oraz nystatyną w stężeniu 50 µg ml<sup>-1</sup> (LB+rif+nyst). Płytki inkubowano przez 7 dni w temp. 28°C.

Zdolność szczepów bakterii endofitycznych do kolonizacji tkanek roślinnych i ich migracji do części nadziemnych oceniano poprzez ich izolację z tkanek życicy. Sterylizację korzeni i części nadziemnych przeprowadzano w sposób opisany w rozdziale 3.2.1. Wybrane rozcieńczenia zawiesiny roślinnej posiewano na stałe podłoże LB+rif+nyst, a płytki

inkubowano w temp. 28°C przez 7 dni. Liczebność 5WK<sup>rif</sup>, 10WK<sup>rif</sup> lub konsorcjum obu szczepów zdolnych do kolonizacji tkanek roślinnych wyrażano w j.t.k. g<sup>-1</sup> ś.m. korzeni lub części nadziemnych życicy trwałej.

### 3.2.6.7. Badanie wpływu introdukowanych szczepów bakterii na przyrost biomasy roślin

W 14, 31 i 75 dniu doświadczenia fitoremediacyjnego rośliny usuwano z doniczek, oczyszczano z gleby i ważono. Po zakończeniu eksperymentu obliczano współczynnik wzrostu roślin (%) korzystając ze wzoru:

$$((M1-M0) / M0) * 100\%$$

gdzie: M1-całkowita biomasa roślin w 75 dniu doświadczenia dla danego układu doświadczalnego; M0-całkowita biomasa roślin w 14 dniu doświadczenia dla danego układu doświadczalnego

### 3.2.6.8. Określenie wpływu wprowadzonych szczepów na ogólną liczebność i liczebność bakterii zdolnych do rozkładu węglowodorów alifatycznych w glebie

Na podstawie liczby kopii genu 16S rRNA w glebie, oznaczonej metodą łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (real-time PCR, qPCR), oceniano wpływ introdukowanych szczepów na ogólną liczebność mikroorganizmów autochtonicznych w badanej glebie. Ponadto, tą samą metodą oznaczano liczbę kopii genu hydroksylazy alkanowej (*alkH*) w celu określenia wpływu introdukowanych szczepów na liczebność mikroorganizmów zdolnych do rozkładu węglowodorów alifatycznych.

Izolację DNA z gleby przeprowadzano za pomocą kitu Power Soil DNA (Mo Bio) zgodnie z załączonym protokołem. Na matrycy uzyskanego DNA przeprowadzano oznaczenie liczby kopii genów 16S rRNA oraz *alkH* metodą qPCR na aparacie LightCycler96 (Roche). Do amplifikacji stosowano startery specyficzne dla genu 16S rRNA pE (5' AAA CTC AAA GGA ATT GAC GG 3') i pF (5' ACG AGC TGA CGA CAG CCA TG 3') (Edwards i wsp., 1989) oraz dla genu *alkH* alk-H1-F (5' CIG IIC ACG AII TIG GIC ACA AGA AGG 3') i alk-H3-R (5' IGC ITG ITG ATC III GTG ICG CTG IAG 3') (Philips i wsp., 2008). Mieszanina reakcyjna o objętości 20 µl zawierała: 10 µl 2×stężonego FastStart Essential DNA Green Master (Roche), 1 µl każdego ze starterów w stężeniu 10 µM, 2 µl matrycowego DNA oraz 6 µl wody. Reakcję qPCR dla genu 16S rRNA przeprowadzano zgodnie z profilem temperatury: 95°C 10 min, 28 cykli obejmujących 95°C 10 s, 57°C 20 s,

72°C 30 s. Natomiast, dla genu *alkH* warunki qPCR były następujące: 10 min 95°C, 30 cykli 95°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min. Detekcję emisji fluorescencji przeprowadzano wykorzystując fluorochrom SYBR Green I, który łączy się z dwuniciowym DNA, w tym również z niespecyficznymi produktami PCR, takimi jak struktury „primer-dimer”. Dlatego, aby zapobiec detekcji tych struktur, na końcu każdego etapu wydłużania, fluorescencję mierzono w temp. 81°C. Krzywe topnienia produktów PCR analizowano w zakresie temp. od 65°C do 95°C. Liczbę kopii obu genów wyznaczano na podstawie krzywych wzorcowych przygotowanych z seryjnych rozcieńczeń standardu. Standard przygotowano zgodnie z protokołem zestawu InstAclone PCR (Thermo Scientific), według którego do wektora pTZ57R/T (Thermo Scientific) wklonowano produkt PCR odpowiadający analizowanemu genom. Czystość i koncentrację DNA standardu oznaczono spektrofotometrycznie (NanoDrop, Thermo Scientific).

### 3.2.7. Analiza statystyczna

Obliczenia oraz wykresy wykonywano z zastosowaniem arkuszy kalkulacyjnych Microsoft®Excel 2010. Przedstawione wyniki są średnimi z trzech powtórzeń  $\pm$  odchylenie standardowe. W przypadku pirosekwencjonowania 454, wyniki są średnimi z czterech powtórzeń  $\pm$  odchylenie standardowe.

Do porównania ubytku TPH w glebie wykorzystano jedno- oraz dwuczynnikową analizę wariancji. Istotność różnic w liczbie kopii genu 16S rRNA jak i *alkH* (qPCR) w glebie w badanych układach doświadczalnych oraz przyroście biomasy życicy trwałej podczas doświadczenia fitoremediacyjnego określano za pomocą analizy wariancji jedno- i trójczynnikowej. Natomiast, porównując liczebność szczepów 5WK i 10WK w glebie i tkankach życicy trwałej oraz indeksy bioróżnorodności wyznaczonych na podstawie wyników pirosekwencjonowania 454 zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji.

W celu określenia stopnia podobieństwa zespołów bakterii endofitycznych komonicy zwyczajnej i jastrzębca wysokiego, przeprowadzano analizę głównych współrzędnych (PCoA) zgodnie z metrykami Unweighted (analiza jakościowa) oraz Weighted (analiza ilościowa) UniFrac.

Istotne statystyczne różnice ( $p < 0,05$ ) między poszczególnymi średnimi oceniano w oparciu o test post-hoc, test Tukeya, z zastosowaniem programu STATISTICA® 13.1 PL.

## IV. Wyniki

### 4.1. Izolacja bakterii endofitycznych zdolnych do wykorzystania surowej ropy naftowej

Rośliny wykorzystane do badań zostały zebrane z terenu, w którym stężenie oleju mineralnego w glebie przekraczało ponad czterokrotnie normy dopuszczalne w Polsce. Poziom TPH wynosił  $12853,34 \pm 322,62 \text{ mg kg}^{-1}$  s.m. gleby. W celu selekcji bakterii zdolnych do rozkładu związków ropopochodnych, endofity izolowano na pożywce M9, w której stężenie surowej ropy naftowej wynosiło 1%. Łącznie wyselekcjonowano 44 różniące się morfologicznie szczepy bakterii endofitycznych z korzeni, łodyg i liści komonicy zwyczajnej (12 szczepów), wiesiołka dwuletniego (14 szczepów) oraz jastrzębca wysokiego (18 szczepów) (Tabela 2).


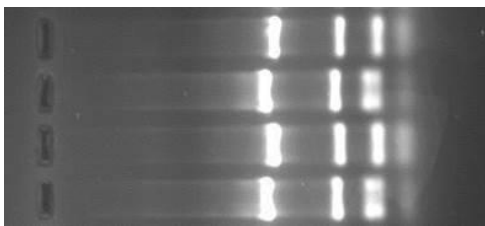

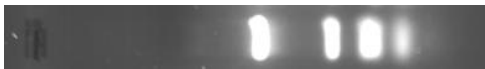
Tabela. 2. Szczepy bakterii endofitycznych wyizolowane z komonicy zwyczajnej, wiesiołka dwuletniego i jastrzębca wysokiego.

	Szczepy bakterii endofitycznych		
	Komonica zwyczajna	Wiesiołek dwuletni	Jastrzębiec wysoki
Korzeń		2WK	
		3WK	
		4WK	1CJK
		5WK	2CJK
		6WK	2CJKA
		6.1WK	4FJK
		7WK	2RJK
		8WK	2RJKA
		8.1WK	3RJK
		10WK	3RJKA
		10.1WK	6RJK
		1FWK	
		1.1FWK	
Łodyga	1XS		
	1.1XS		
	2.1XS		6RJS1
	4XS		6RJS2
	5XS		7RJS
	5.1XS	3.1FWS	7RJS1
	6.1XS		7RJSS
	2FXS		10RJS
	5FXS		
	6FXS		
Liść	1XL		3RJL
	5XL		3RJLA
			5RJL

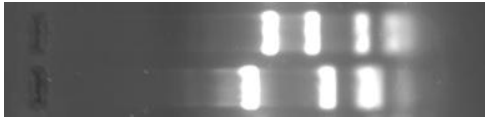


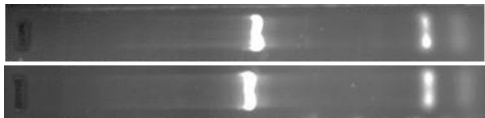
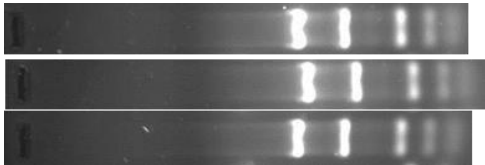



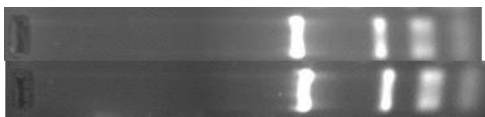

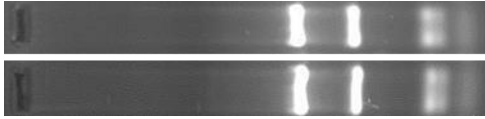
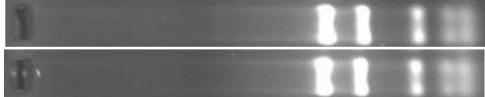
## 4.2. Określenie przynależności gatunkowej izolatów

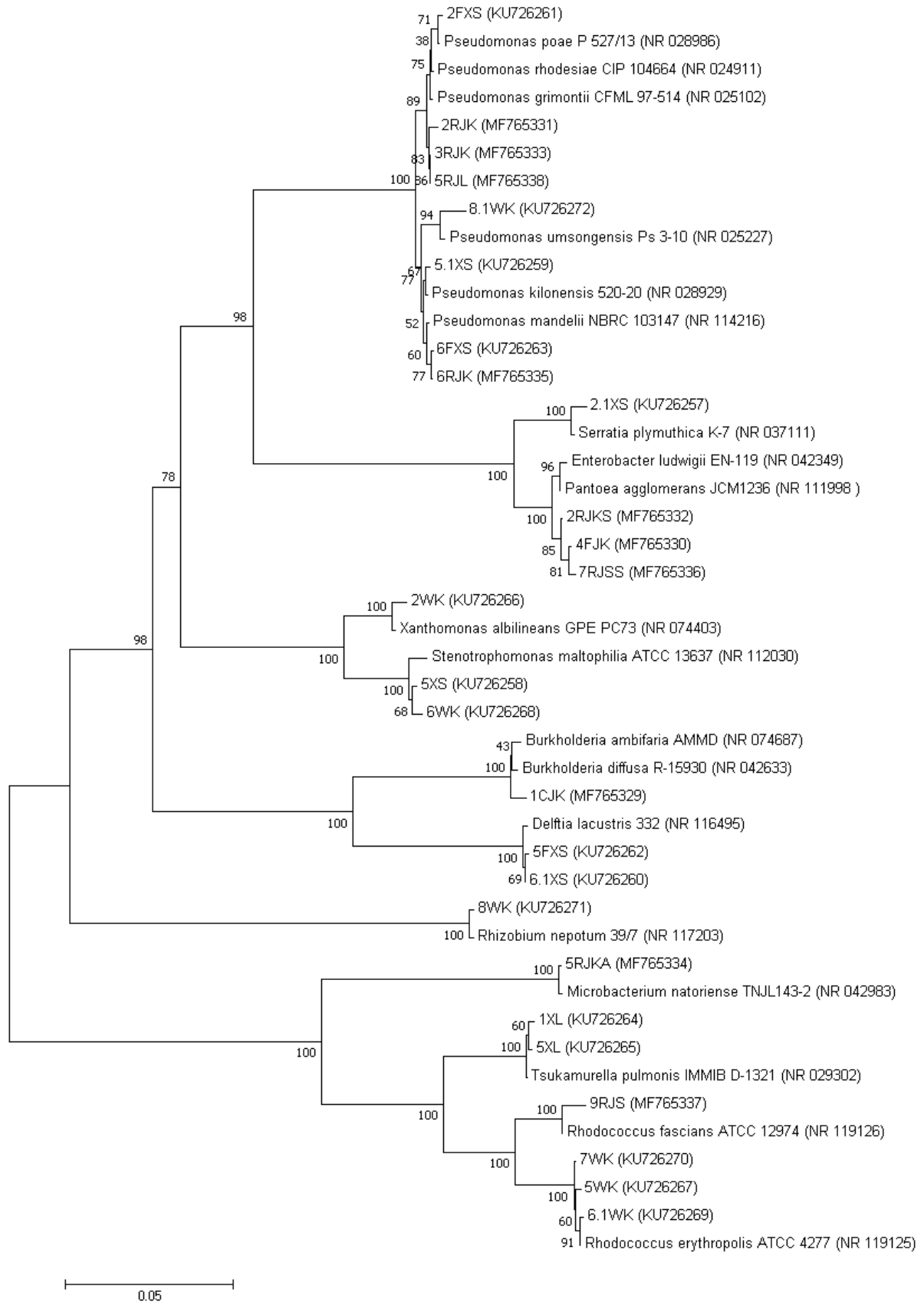
Metodą ARDRA przeprowadzono analizę różnorodności genetycznej izolatów. Analiza restrykcyjna fragmentu genu 16S rRNA pozwoliła na wyróżnienie 26 profili ARDRA, przedstawiających różne wzory prążków (Tabela 3). Na podstawie sekwencji fragmentu genu 16S rRNA i porównania z sekwencjami nuleotydów w bazie NCBI, przy wykorzystaniu algorytmu BLAST, określono przynależność gatunkową bakterii endofitycznych. Podobieństwo filogenetyczne izolatów do najbliższych im wzorcowych szczepów przedstawiono na Rys. 9. Otrzymane drzewo filogenetyczne składa się z 42 węzłów, z których tylko dwa zostały zweryfikowane wartościami bootstrap, mniejszymi niż 50%. W przypadku izolatów z rodzaju *Pseudomonas* szczepy, 2RJK, 3RJK i 5RJL, są w dużym stopniu filogenetycznie do siebie podobne. Podobnie, szczepy z rodziny *Enterobacteriaceae*: 2RJKS, 4FJK, 7RJSS wykazują duże podobieństwo względem siebie.

Tabela 3. Profile ARDRA uzyskane przez cięcie fragmentu genu 16S rRNA enzymem restrykcyjnym HpyCH4IV. Przynależność gatunkowa wyizolowanych endofitów.

Profil ARDRA	Gatunek o najbliższym stopniu pokrewieństwa (% podobieństwa)	numer ACC	Szczep wysłany do sekwencjonowania	Szczepy o tym samym profilu ARDRA
	<i>Burkholderia ambifaria</i> (99%)	MF765329	1CJK	
	<i>Enterobacter ludwigii</i> (100%) <i>Pseudomonas rhodesiae</i> (99%) <i>Enterobacter ludwigii</i> (100%) <i>Pseudomonas grimontii</i> (99%)	MF765330 MF765331 MF765332 MF765333	4FJK 2RJK 2RJKA 3RJK	
	<i>Microbacterium natorense</i> (99%)	MF765334	3RJKA	2CJK
	<i>Pseudomonas mandeli</i> (100%)	MF765335	6RJK	6RJS1 6RJS2 7RJS 7RJS1 3RJL 3RJLA

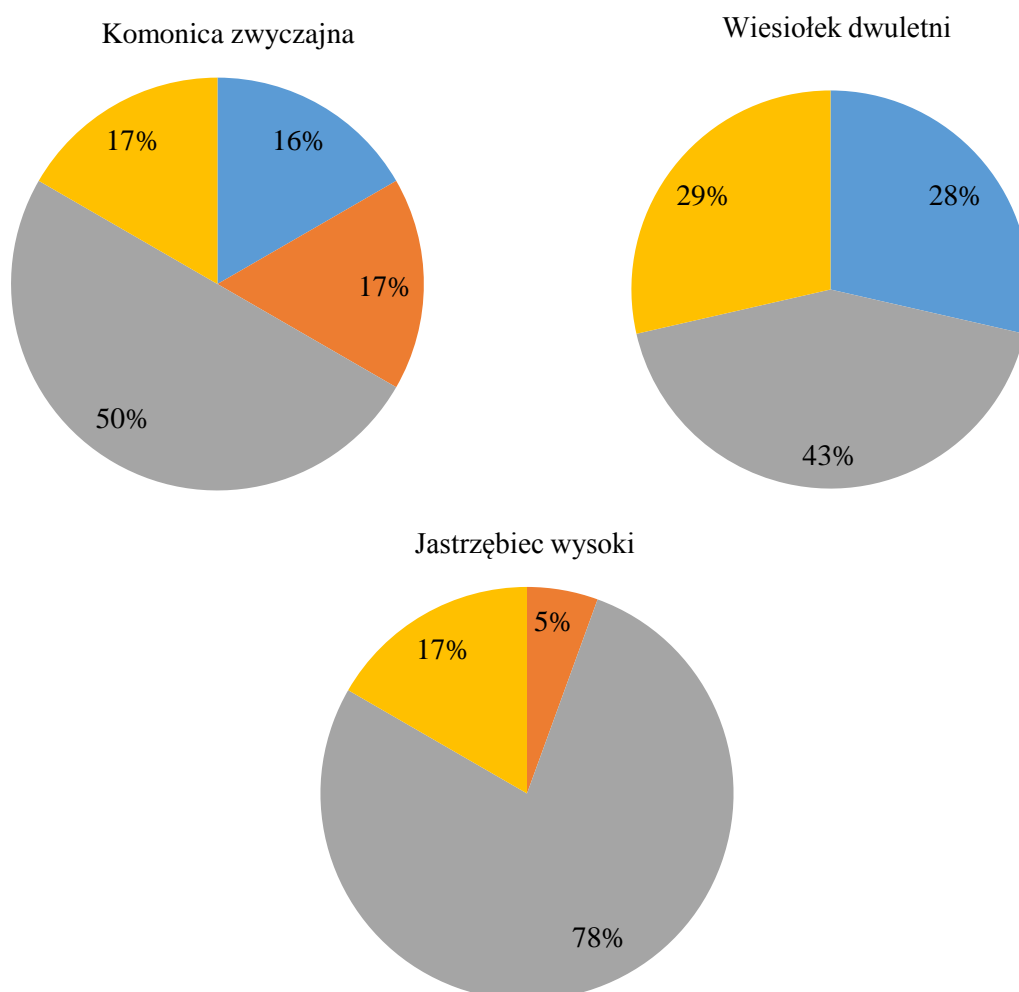


	<i>Pantoea agglomerans</i> (100%) <i>Rhodococcus fascians</i> (100%)	MF765336 MF765337	7RJSS 10RJS	2CJKA
	<i>Pseudomonas rhodesiae</i> (100%)	MF765338	5RJL	
	<i>Xanthomonas albilineans</i> (99%)	KU726266	2WK	3.1FWS
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (98%)	KU726268 KU726258	6WK 5XS	3WK 1.1XS
	<i>Rhodococcus erythropolis</i> (98%)	KU726267 KU726269 KU726270	5WK 6.1WK 7WK	4WK
	<i>Rhizobium nepotum</i> (99%)	KU726271	8WK	10WK 10.1WK 1.1FWK 1XS 4XS
	<i>Pseudomonas umsongensis</i> (99%)	KU726272	8.1WK	1FWK
	<i>Serratia plymuthica</i> (99%)	KU726257	2.1XS	
	<i>Pseudomonas kilonensis</i> (99%) <i>Pseudomonas mandelii</i> (99%)	KU726259 KU726263	5.1XS 6FXS	
	<i>Pseudomonas poae</i> (99%)	KU726261	2FXS	
	<i>Delftia lacustris</i> (99%)	KU726260 KU726262	6.1XS 5FXS	
	<i>Tsukamurella tyrosinosolvens</i> (99%) <i>Tsukamurella pulmonis</i> (99%)	KU726264 KU726265	1XL 5XL	



Rys. 9. Drzewo filogenetyczne 26 izolatów komonicy zwyczajnej, wiesiołka dwuletniego i jastrzębca wysokiego, których przynależność gatunkową oznaczono na podstawie sekwencjonowania fragmentu genu 16S rRNA (Neighbor-Joining, bootstrap n=1000, program MEGA 7.0).

Wyizolowane bakterie endofityczne zaklasyfikowano do 12 rodzajów zgrupowanych w klasach *Alpha*-, *Beta*-, *Gammaproteobacteria* oraz *Actinobacteria*. Bakterie zaliczane do wszystkich wymienionych klas stwierdzono jedynie u komonicy, natomiast wśród endofitów wiesiołka nie odnaleziono bakterii hodowalnych należących do *Betaproteobacteria*. Z kolei, wśród izolatów jastrzębca nie zidentyfikowano bakterii zaliczanych do *Alphaproteobacteria* (Rys. 10). Większość wyizolowanych szczepów ze wszystkich badanych gatunków roślin zaklasyfikowano do *Gammaproteobacteria*, a wśród szczepów jastrzębca, aż 78% izolatów należało do tej klasy (Rys. 10).

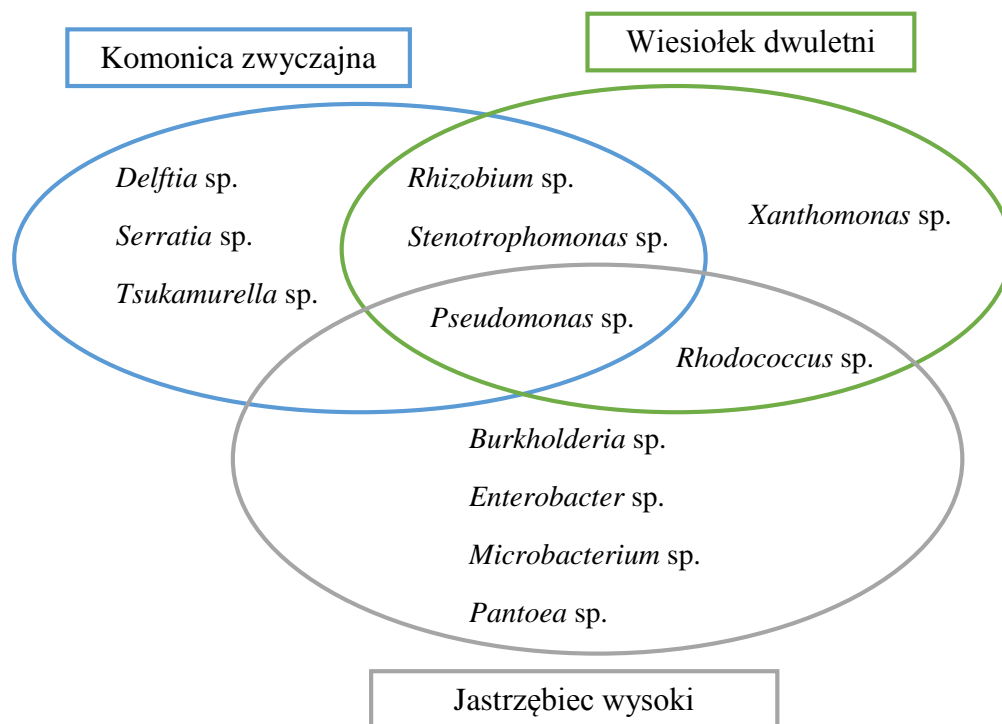


Rys. 10. Przynależność taksonomiczna wyizolowanych szczepów bakterii endofitycznych komonicy zwyczajnej, wiesiołka dwuletniego oraz jastrzębca wysokiego.

■ *Alpha*-, ■ *Beta*-, ■ *Gammaproteobacteria*, ■ *Actinobacteria*.

Gatunki bakterii zaliczne do *Delftia* sp., *Serratia* sp., *Tsukamurella* sp. występowały tylko w tkankach komonicy (Rys. 11). Dla mikrobiomu wiesiołka charakterystyczne były bakterie należące do rodzaju *Xanthomonas*, natomiast bakterie *Burkholderia* sp.,

*Enterobacter* sp., *Microbacterium* sp. oraz *Pantoea* sp. występowały tylko wśród izolatów z jastrzębca. Endofity zaliczane do rodzajów *Rhizobium* i *Rhodococcus* najliczniej występowały w tkankach wiesiołka. U pozostałych gatunków roślin dominowały bakterie z rodzaju *Pseudomonas*. Odpowiednio, wśród bakterii komonicy stanowiły one 25%, natomiast u jastrzębca, aż 55,5% wszystkich izolatów.



Rys. 11. Bakterie endofityczne występujące w tkankach komonicy zwyczajnej, wiesiołka dwuletniego i jastrzębca wysokiego.

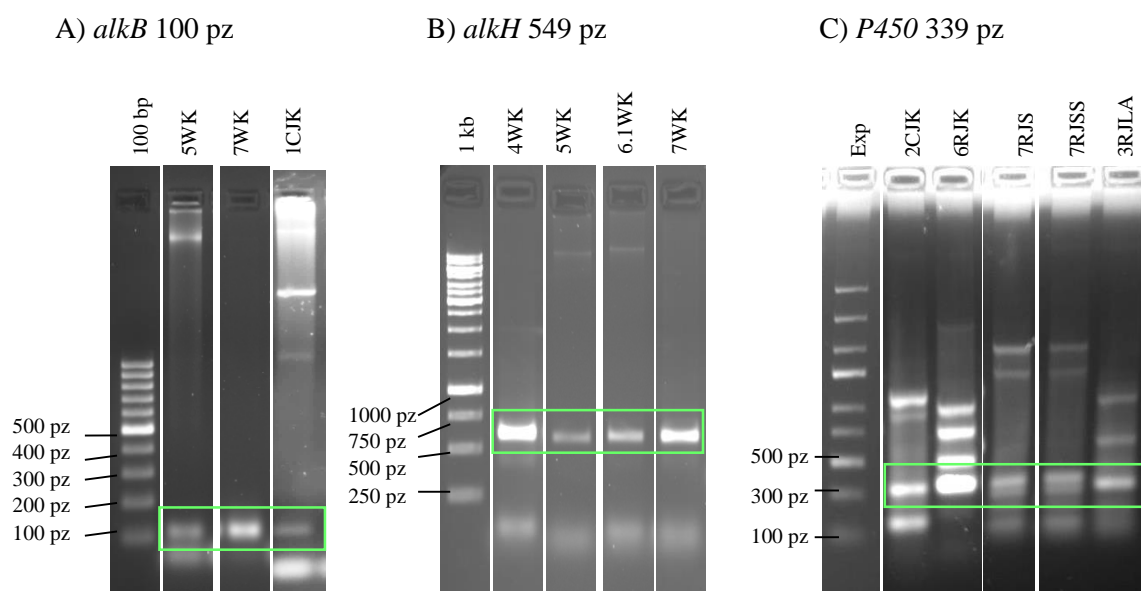
#### 4.3. Ocena wykorzystania węglowodorów jako jedyne go źródła węgla i energii przez bakterie endofityczne

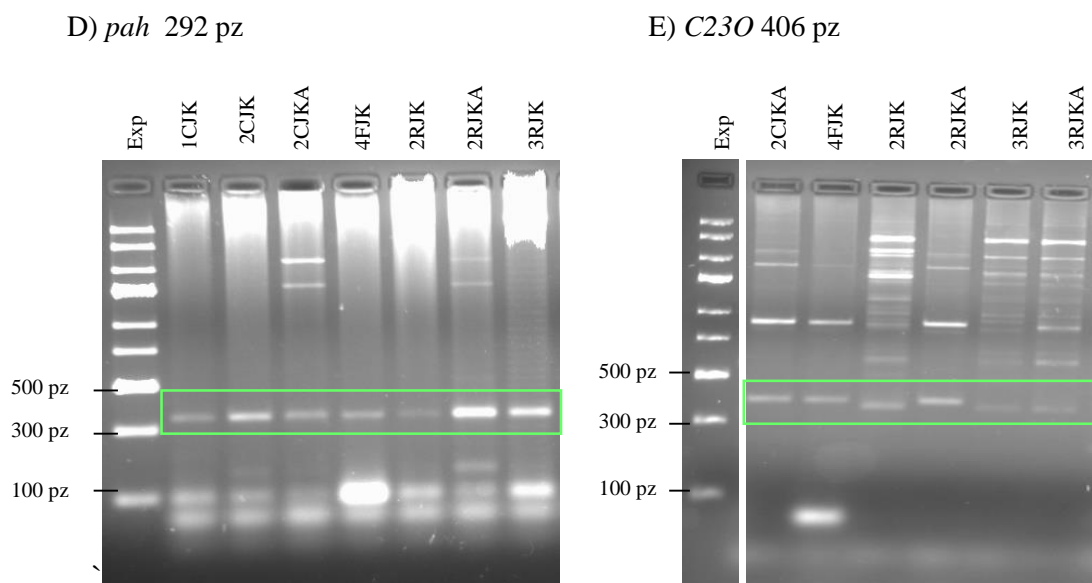
Izolaty testowano pod kątem ich zdolności do wzrostu w obecności oleju diesla, *n*-heksadekanu i *p*-ksylenu oraz potencjalnego wykorzystania tych węglowodorów jako jedyne go źródła węgla i energii (Tabela 4). Ponad 90% wszystkich badanych endofitów, izolowanych z komonicy oraz wiesiołka, było zdolnych do wzrostu w obecności oleju diesla. Natomiast, wśród endofitów jastrzębca 77,8% bakterii posiadało tę cechę. Możliwość wykorzystania *n*-heksadekanu jako źródło węgla zaobserwowano u 16,7%, 28,6% i 44,4% bakterii wyizolowanych odpowiednio z tkanek komonicy, wiesiołka i jastrzębca. Żaden z badanych szczepów nie wykorzystywał *p*-ksylenu jako jedyne go źródła węgla. Zdolność do

wzrostu w obecności wybranych węglowodorów wśród izolatów wszystkich roślin kształtuje się według schematu: surowa ropa naftowa > olej diesla > *n*-heksadekan.

#### 4.4. Detekcja genów kodujących enzymy zaangażowane w rozkład węglowodorów

Detekcję genów kodujących enzymy zaangażowane w degradację węglowodorów, u wyizolowanych bakterii endofitycznych, przeprowadzono za pomocą reakcji PCR (Tabela 4). Spośród 44 badanych szczepów u sześciu: *Burkholderia ambifaria* 1CJK, *Pseudomonas mandelii* 6FXS i *Rhodococcus* sp. (4WK, 5WK, 6.1WK, 7WK) stwierdzono obecność genu *alkB* kodującego monooksygenazę alkanową (Rys. 12). Pozytywny wynik amplifikacji genu *alkH* obserwowano u 7 szczepów, należących do rodzajów *Tsukamurella* i *Rhodococcus*. Gen *P450*, kodujący enzymy spokrewnione z cytochromem P450 (rodzina CYP153), wykryto u 41,7%, 42,9% i 38,9% endofitów wyizolowanych odpowiednio z komonicy, wiesiołka i jastrzębca (Rys. 12). Ponadto, tylko wśród izolatów jastrzębca występowały szczepy, u których stwierdzono obecność genów kodujących dioksygenazę-2,3-katecholu (*C23O*) (61,1% wszystkich izolatów) i podjednostkę alfa dioksygenaz hydroksylujących wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (*pah*) (88,9% wszystkich izolatów).

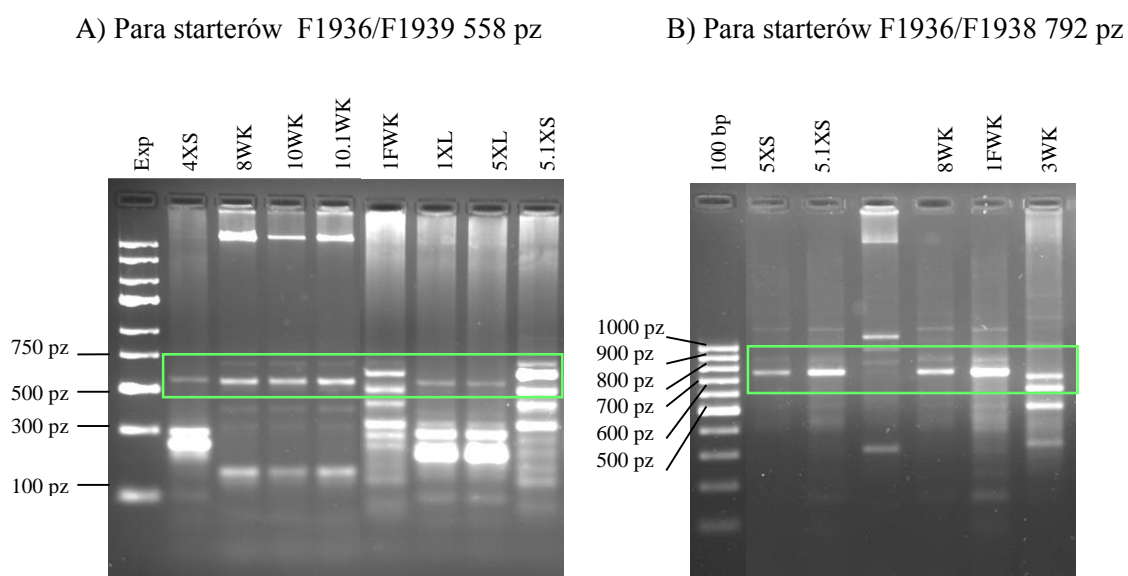




Rys. 12. Przykładowe elektroforogramy rozdziału produktów reakcji PCR dla genów (A) *alkB*, (B) *alkH*, (C) *P450*, (D) *pah*, (E) *C23O*. Oznaczenia: nad liniami umieszczono nazwę szczepu lub nazwę markera wielkości: 100 bp, 1 kb, Exp-Express DNA Ladder.

#### 4.5. Detekcja genu *acdS*

Wyniki przeprowadzonych reakcji PCR z wykorzystaniem zdegenerowanych starterów pozwoliły na detekcję u bakterii endofitycznych genu *acdS* kodującego deaminazę ACC (Rys. 13). Wśród izolatów komonicy, wiesiołka i jastrzębca odpowiednio 41,7%, 42,8%, 77,8% bakterii posiadało gen *acdS*. Nie wykryto tego genu u badanych szczepów należących do rodzaju *Rhodococcus*.



Rys. 13. Przykładowe elektroforogramy rozdziału produktów reakcji PCR dla genu *acdS* z wykorzystaniem odpowiednich par starterów: (A) F1936/F1939, (B) F1936/F1938. Oznaczenia: nad liniami umieszczono nazwę szczepu lub nazwę markera wielkości: Exp-Express DNA Ladder i 100 bp.

## 4.6. Biochemiczna charakterystyka bakterii endofitycznych

### 4.6.1. Mechanizmy promujące wzrost roślin

U wszystkich wyizolowanych endofitów oceniano obecność mechanizmów potencjalnie odpowiedzialnych za promowanie wzrostu roślin. Uzyskane wyniki zebrano w Tabeli 4.

Tabela 4. Charakterystyka bakterii endofitycznych wyizolowanych z tkanek komonicy zwyczajnej, wiesiołka dwuletniego i jastrzębca wysokiego.

			Sekwencjonowanie genu 16S rRNA	Właściwości bakterii endofitycznych						Geny <sup>f</sup>						Potencjal degradacyjny			
Roślina	Tkanka	Szczep	Gatunek o najbliższym stopniu pokrewieństwa	PS <sup>a</sup>	IAA <sup>b</sup>	HCN <sup>c</sup>	SID <sup>d</sup>	CMC <sup>e</sup>	Ruch	<i>acdS</i>	<i>alkB</i>	<i>alkH</i>	<i>P450</i>	<i>C23O</i>	<i>pah</i>	Surowa ropa	Olej diesla	<i>n</i> -heksadekan	
Komonica zwyczajna	Łodyga	1XS	<i>Rhizobium</i> sp.	1,0±0,0	35,9±3,7	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	
		1.1XS	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	-	24,3±0,9	+++	ng	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
		2.1XS	<i>Serratia plymuthica</i>	1,8±0,5	5,8±0,1	++	+	6,3±1,2	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
		4XS	<i>Rhizobium</i> sp.	-	18,8±0,6	++	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
		5XS	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	22,1±1,5	+++	ng	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
		5.1XS	<i>Pseudomonas kilonensis</i>	7,3±0,6	12,0±0,3	+	-	4,7±0,6	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-
		6.1XS	<i>Delftia lacustris</i>	-	59,9±4,0	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-
		2FXS	<i>Pseudomonas poae</i>	10,3±1,5	7,9±0,3	+++	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
		5FXS	<i>Delftia lacustris</i>	-	62,6±5,2	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
		6FXS	<i>Pseudomonas mandelii</i>	2,3±0,6	16,5±0,8	++	+	7,7±1,5	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
	Liść	1XL	<i>Tsukamurella tyrosinosolvens</i>	5,3±0,6	2,0±0,3	+	+	15,3±2,1	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	
		5XL	<i>Tsukamurella pulmonis</i>	5,67±0,6	1,9±0,2	++	+	14,7±0,6	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	
	Udział procentowy (%)			58,3	100	83,3	50	41,7	83,3	41,7	8,3	16,7	41,7	0	0	100	91,7	16,7	



Roślina	Tkanka	Szczep	Sekwencjonowanie genu 16S rRNA	Właściwości bakterii endofitycznych						Geny <sup>f</sup>						Potencjał degradacyjny		
			Gatunek o najbliższym stopniu pokrewieństwa	PS <sup>a</sup>	IAA <sup>b</sup>	HCN <sup>c</sup>	SID <sup>d</sup>	CMC <sup>e</sup>	Ruch	<i>acdS</i>	<i>alkB</i>	<i>alkH</i>	<i>P450</i>	<i>C23O</i>	<i>pah</i>	Surowa ropa	Olej diesla	<i>n</i> -heksadekan
Wiesiołek dwuletni	Korzeń	2WK	<i>Xanthomonas albilineans</i>	-	17,2±1,1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
		3WK	<i>Stenotrophomonas</i> sp.	-	23,4±2,0	+++	ng	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
		4WK	<i>Rhodococcus</i> sp.	-	1,8±0,1	+	ng	2,3±0,6	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
		5WK	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	-	1,4±0,1	-	ng	2,0±0,0	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
		6WK	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	18,6±2,8	+++	ng	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
		6.1WK	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	-	2,0±0,2	+++	ng	2,7±0,6	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
		7WK	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	-	1,3±0,0	+++	ng	1,7±0,6	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
		8WK	<i>Rhizobium nepotum</i>	3,0±0,0	15,3±1,8	-	-	1,7±0,6	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
		8.1WK	<i>Pseudomonas umsongensis</i>	4,0±0,6	7,9±1,2	+++	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-
		10WK	<i>Rhizobium</i> sp.	-	27,5±1,0	-	-	1,7±0,6	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
		10.1WK	<i>Rhizobium</i> sp.	-	29,6±1,0	++	-	2,0±0,0	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
		1FWK	<i>Pseudomonas</i> sp.	3,0±0,0	7,5±0,2	-	+	2,0±0,0	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-
		1.1FWK	<i>Rhizobium</i> sp.	1,3±0,6	22,5±1,5	+++	-	3,0±1,0	+	+	-	-	-	-	-	+	+	-
	Łodyga	3.1FWS	<i>Xanthomonas</i> sp.	-	16,3±1,0	+++	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	Udział procentowy (%)			28,6	100	64,3	14,3	64,3	71,4	42,86	28,6	28,6	42,9	0	0	100	92,9	28,6

Roślina	Tkanka	Szczep	Sekwencjonowanie genu 16S rRNA	Właściwości bakterii endofitycznych						Geny <sup>f</sup>						Potencjał degradacyjny		
			Gatunek o najbliższym stopniu pokrewieństwa	PS <sup>a</sup>	IAA <sup>b</sup>	HCN <sup>c</sup>	SID <sup>d</sup>	CMC <sup>e</sup>	Ruch	<i>acdS</i>	<i>alkB</i>	<i>alkH</i>	<i>P450</i>	<i>C23O</i>	<i>pah</i>	Surowa ropa	Olej diesla	<i>n</i> -heksadekan
Jastrzębiec wysoki	Korzeń	1CJK	<i>Burkholderia ambifaria</i>	-	2,6±0,2	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+
		2CJK	<i>Microbacterium</i> sp.	-	2,6±0,1	-	ng	17,3±2,1	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+
		2CJKA	<i>Pantoea</i> sp.	-	52,2±8,0	++	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
		4FJK	<i>Enterobacter ludwigii</i>	-	68,8±6,2	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
		2RJK	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	-	2,0±0,3	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
		2RJKA	<i>Enterobacter ludwigii</i>	-	76,4±3,1	+++	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
		3RJK	<i>Pseudomonas grimontii</i>	-	2,7±0,3	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
		3RJKA	<i>Microbacterium natorienae</i>	-	4,6±0,4	-	ng	14,3±1,1	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+
		6RJK	<i>Pseudomonas mandelii</i>	-	5,6±1,5	+++	-	5,3±0,3	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	Łodyga	6RJS1	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	2,1±0,4	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
		6RJS2	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	1,8±0,1	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
		7RJS	<i>Pseudomonas</i> sp.	3,7±0,5	3,9±2,4	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
		7RJS1	<i>Pseudomonas</i> sp.	8,0±1,0	2,7±0,3	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
		7RJSS	<i>Pantoea agglomerans</i>	9,3±1,3	2,5±0,3	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+
		10RJS	<i>Rhodococcus fascians</i>	-	2,5±0,4	++	ng	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
	Liść	3RJL	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	2,9±0,6	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
		3RJLA	<i>Pseudomonas</i> sp.	-	2,1±0,5	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+
		5RJL	<i>Pseudomonas rhodesiae</i>	-	2,0±0,5	-	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
	Udział procentowy (%)			16,7	100	33,3	16,7	16,7	88,9	77,8	5,6	5,6	38,9	61,1	88,9	100	77,8	44,4

Oznaczenia: a-PS-rozpuszczanie fosforanów, średnica strefy przejaśnienia [mm]; b-IAA-produkcja kwasu indolilo-3-octowego [ $\mu\text{g}$  IAA  $\text{ml}^{-1}$  podłoża]; c-HCN-produkcja cyjanowodoru, - brak; + niska; ++ średnia; +++ wysoka; d-SID-produkcja sideroforów, - brak; + obecne; ng brak wzrostu szczepu na podłożu CAS; e-CMC-produkcja enzymów celulolitycznych, średnica strefy przejaśnienia [mm]; f-Identyfikacja genów kodujących: enzym deaminazę ACC *acdS*, monooksygenazę alkanową *alkB*, hydrosylazę alkanową *alkH*, enzymy spokrewnione z cytochromem P450 *P450*, dioksygenazę-2,3-katecholu *C23O*, podjednostkę alfa dioksygenaz hydroksylujących wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne *pah*;  $\pm$  odchylenie standardowe z trzech powtórzeń.

Przeprowadzone badania wykazały, że 58,3% izolatów komonicy tworzyło przejaśnienia na pożywce Pikovskaya, co świadczy o zdolności tych bakterii do rozpuszczania fosforanów i uwalniania fosforu z jego nierozpuszczalnej soli. Największe strefy przejaśnień ( $>10$  mm) obserwowano u szczepu *Pseudomonas* sp. 2FXS. Prawie 30% endofitycznych szczepów wiesiołka wykazywało zdolność do rozpuszczania fosforanów, ale ich aktywność była niska, a strefy przejaśnień mieściły się w granicach od  $1,3 \pm 0,6$  do  $3,0 \pm 0,0$  mm. Wśród endofitów jastrzębca zaobserwowano, że tylko trzy szczepy były zdolne do solubilizacji fosforanów: *Pseudomonas* sp. 7RJS ( $3,7 \pm 0,5$  mm), *Pseudomonas* sp. 7RJS1 ( $8,0 \pm 1,0$  mm) i *Pantoea agglomerans* 7RJSS ( $9,3 \pm 1,3$  mm).

Wszystkie badane szczepy były zdolne do uwalniania IAA podczas hodowli na podłożu z dodatkiem tryptofanu. Koncentracja IAA w przeliczeniu na ml podłoża po hodowli szczepów wahała się w granicach od  $1,8 \pm 0,1$  do  $76,4 \pm 3,1$   $\mu\text{g IAA ml}^{-1}$  podłoża. Najwyższe stężenie IAA obserwowano w pohodowlanym supernatancie szczepów izolowanych z korzeni jastrzębca: *Enterobacter ludwigii* 2RJKA ( $76,4 \pm 3,1$   $\mu\text{g IAA ml}^{-1}$  podłoża), *Enterobacter ludwigii* 4FJK ( $68,8 \pm 6,2$   $\mu\text{g IAA ml}^{-1}$  podłoża) oraz szczepów izolowanych z łodyg komonicy: *Delftia lacustris* 5FXS, *Delftia lacustris* 6.1XS i *Rhizobium* sp. 1XS, które wytworzyły odpowiednio  $62,6 \pm 5,2$ ;  $59,9 \pm 4,0$  i  $35,9 \pm 3,7$   $\mu\text{g IAA ml}^{-1}$  podłoża.

Szczepy wytwarzające HCN stanowiły 83,3%, 64,3% i 33,3% wszystkich bakterii endofitycznych izolowanych odpowiednio z komonicy, wiesiołka i jastrzębca. Zdecydowana większość z nich charakteryzowała się wydzielaniem dużych ilości HCN, na co wskazywało ciemnobrązowe zabarwienie bibuły w przeprowadzonym teście.

Produkcję sideroforów zaobserwowano u połowy (50%) wyizolowanych szczepów endofitycznych z komonicy. Wśród izolatów jastrzębca tylko 16,7% wykazywało zdolność do syntezy sideroforów. Z kolei, wśród bakterii endofitycznych wiesiołka ten odsetek był jeszcze niższy i wynosił 14,3% wszystkich izolatów. Kilkanaście szczepów, pomimo wielu prób, nie było zdolnych do wzrostu na podłożu CAS.

#### 4.6.2. Produkcja enzymów celulolitycznych

Zdolność do produkcji enzymów celulolitycznych to cecha często warunkująca możliwość kolonizacji korzeni przez bakterie. Ocenę tej zdolności bakterii przeprowadzono na podłożu z karboksymetylocelulozą. Odsetek potencjalnych producentów celulaz wśród szczepów komonicy i wiesiołka wynosił odpowiednio 47,7% i 64,3% wszystkich izolatów (Tabela 4). Średnice powstałych stref przejaśnień dla bakterii endofitycznych izolowanych

z tkanek komonicy były nawet 5 razy większe niż te powstałe podczas hodowli izolatów wiesiołka. Tylko trzy szczepy bakterii endofitycznych jastrzębca były zdolne do wzrostu i rozkładu karboksymetylocelulozy.

#### 4.6.3. Zdolność do ruchu

Aktywny ruch bakterii endofitycznych jest jedną z cech ułatwiającą im efektywną kolonizację swojego gospodarza. W testach płytkowych duża liczba szczepów wykazywała zdolność do poruszania się. Wśród endofitów komonicy, wiesiołka i jastrzębca bakterie te stanowiły odpowiednio 83,3%, 71,4% i 88,9% wszystkich izolatów.

#### 4.6.4. Hamowanie wzrostu fitopatogennych grzybów

Bakterie endofityczne często posiadają zdolność do produkowania i wydzielania związków, które hamują wzrost i rozwój fitopatogenów np. grzybów mikroskopowych. Jest to jeden z pośrednich mechanizmów, związany z promowaniem wzrostu roślin. W przeprowadzonych badaniach widoczne strefy zahamowania wzrostu grzybni *C. sphaerospermum* KKP741, *F. avenaceum* KKP756 oraz *F. graminearum* KKP1771 potwierdzały właściwości przeciwgrzybowe wyizolowanych bakterii endofitycznych.

Wśród szczepów izolowanych z tkanek komonicy obserwowano zróżnicowaną zdolność do hamowania wzrostu grzybni trzech badanych gatunków grzybów mikroskopowych. Spośród badanych endofitów tylko 6 wyizolowanych z łodyg komonicy (szczepy 1.1XS, 2.1XS, 5XS, 6.1XS, 2FXS, 5FXS) ograniczało wzrost grzybni *C. sphaerospermum* KKP741. Aż 58,3% izolatów komonicy hamowało wzrost grzybni *F. avenaceum* KKP756. Natomiast, tylko jeden szczep, *Serratia plymuthica* 2.1XS, ograniczał wzrost grzybni *F. graminearum* KKP1771. Co więcej, ten szczep, jako jedyny wśród wszystkich badanych bakterii endofitycznych, wykazywał właściwości przeciwgrzybowe wobec trzech testowanych gatunków grzybów mikroskopowych.

Spośród izolatów wiesiołka 57,1% szczepów hamowało wzrost grzybni *F. avenaceum* KKP756. Tylko jeden szczep, *Xanthomonas* sp. 3.1FWS, ograniczał wzrost *C. sphaerospermum* KKP741.

Szczep *Burkholderia ambifaria* 1CJK, jako jedyny spośród endofitów wyizolowanych z tkanek jastrzębca działał hamująco na wzrost grzybni *C. sphaerospermum* KKP741 i *F. avenaceum* KKP756.

#### 4.6.5. Biosynteza biosurfaktantów/bioemulsyfikatorów

Hydrofobowa natura węglowodorów ropopochodnych utrudnia ich biodegradację. Dlatego oceniano zdolność szczepów do produkcji biosurfaktantów/bioemulsyfikatorów powodujących emulgację tych zanieczyszczeń, a tym samym zwiększenie ich biodostępności dla mikroorganizmów i roślin.

Przyjmuje się, że jeżeli wartość indeksu emulsyfikacji (E24) jest wyższa niż 40% to biosurfaktanty efektywnie emulgują związki ropopochodne. W przeprowadzonych badaniach spośród wszystkich szczepów tylko 6: *S. plymuthica* 2.1XS, *D. lacustris* 6.1XS, *Rhodococcus* sp. 4WK, *R. erythropolis* 6.1WK, *R. nepotum* 8WK i *P. umsongensis* 8.1WK, spełniało to kryterium (Tabela 5).

Tabela 5. Indeksy emulsyfikacji wyznaczone dla biosurfaktantów/bioemulsyfikatorów produkowanych przez bakterie endofityczne, dla których wartość E24 była wyższa niż 40%.

Szczep	Indeks emulsyfikacji (E24) [%]					
	M9+surowa ropa naftowa			M9+n-heksadekan		
	D*	H*	X*	D	H	X
<i>Serratia plymuthica</i> 2.1XS	-	-	41,7±0,8	-	-	-
<i>Delftia lacustris</i> 6.1XS	-	-	41,7±0,4	-	-	-
<i>Rhodococcus</i> sp. 4WK	52,8±0,5	52,8±1,4	58,3±0,6	47,2±0,4	47,2±0,4	52,8±0,9
<i>Rhodococcus erythropolis</i> 6.1WK	-	-	-	50,0±0,5	-	50,0±0,5
<i>Rhizobium nepotum</i> 8WK	-	-	47,2±0,5	-	-	-
<i>Pseudomonas umsongensis</i> 8.1WK	-	-	47,2±0,3	-	-	-

\* D-olej diesla, H-n-heksadekan; X-p-ksylen; E24±odchylenie standardowe z trzech powtórzeń

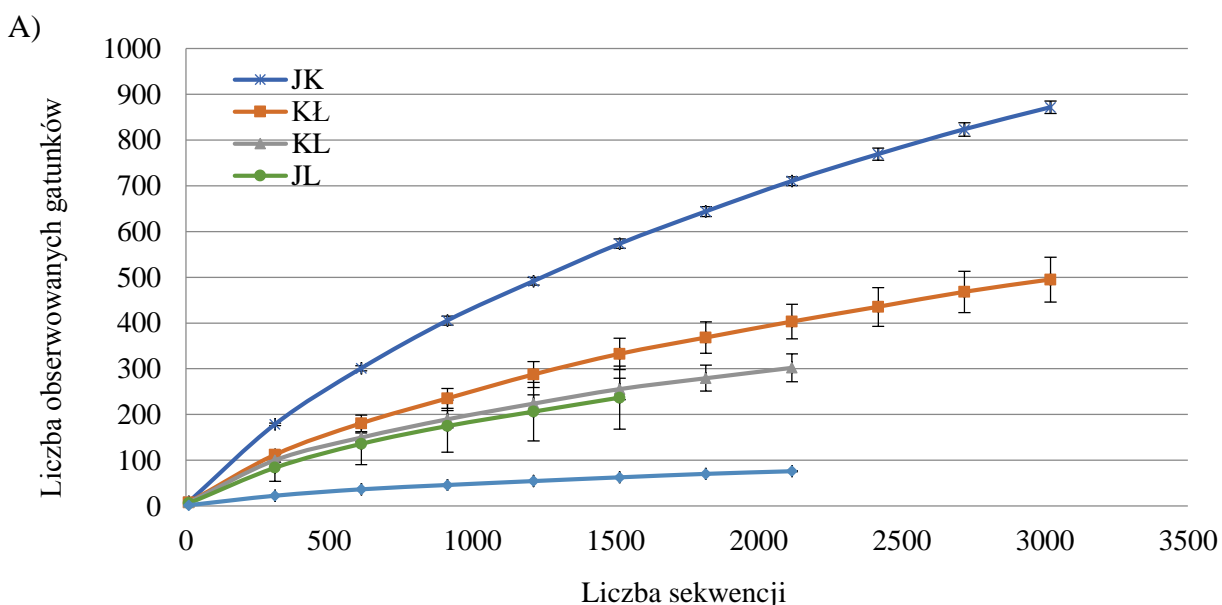
Biosurfaktanty/bioemulsyfikatory produkowane przez szczep *Rhodococcus* sp. 4WK wykazywały najwyższą zdolność do emulgowania oleju diesla, n-heksadekanu i p-ksylenu, na co wskazuje wartość E24, która wynosiła 52,8% w przypadku pierwszych dwóch związków i 58,3% dla p-ksylenu. Biosurfaktanty produkowane przez bakterie podczas ich hodowli na podłożu M9 z surową ropą naftową powodowały głównie emulsyfikację p-ksylenu. Natomiast biosurfaktanty syntetyzowane przez szczep 6.1WK, podczas jego wzrostu na podłożu M9 z n-heksadekanem, prowadziły do emulsyfikacji oleju diesla oraz p-ksylenu, ale nie n-heksadekanu.

#### 4.7. Bioróżnorodność zespołów bakterii endofitycznych

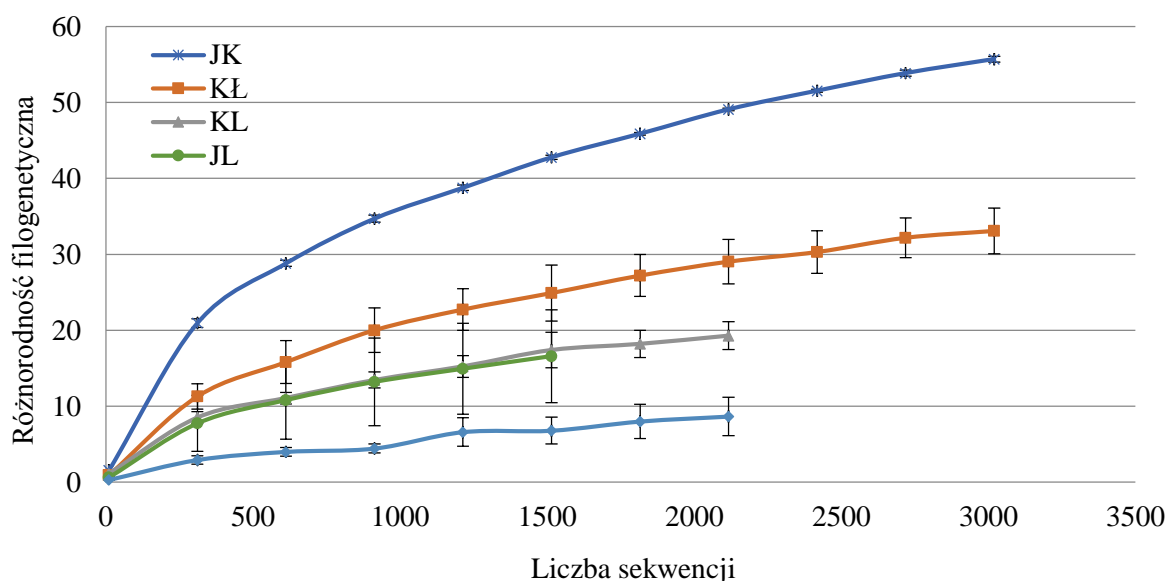
Bioróżnorodność zespołów bakterii endofitycznych komonicy zwyczajnej oraz jastrzębca wysokiego analizowano przy pomocy metody pirosekwencjonowania 454.

W wyniku pirosekwencjonowania na aparacie 454 Genom Sequencer FLX Titanium otrzymano łącznie 148 799 sekwencji, z których 138 684 (93%) posiadało odpowiednie MID i zostało wykorzystane w analizie. Średnia długość uzyskanego odczytu wynosiła 340,95 pz. Po przetworzeniu danych przez QIIME, zgodnie ze strategią 'open reference', usunięciu sekwencji niskiej jakości, odcięciu adaptorów, MID oraz starterów uzyskano 87 331 sekwencji wysokiej jakości. Następnie, usunięto chimery oraz sekwencje odpowiadające DNA chloroplastowemu, eukariotycznemu oraz *Archaea*. W ten sposób otrzymano 64 833 bakteryjnych sekwencji wysokiej jakości, które ostatecznie poddano dalszej analizie.

Krzywe rarefakcji dla badanych prób zostały wykreślone na podstawie liczby otrzymanych OTU oraz różnorodności filogenetycznej (Rys. 14). Wynika z nich, że najwyższą liczbę obserwowanych gatunków zanotowano dla korzeni jastrzębca, najmniejszą dla korzeni komonicy, natomiast próby KŁ, KL i JL zawierały podobną liczbę OTU.



B)

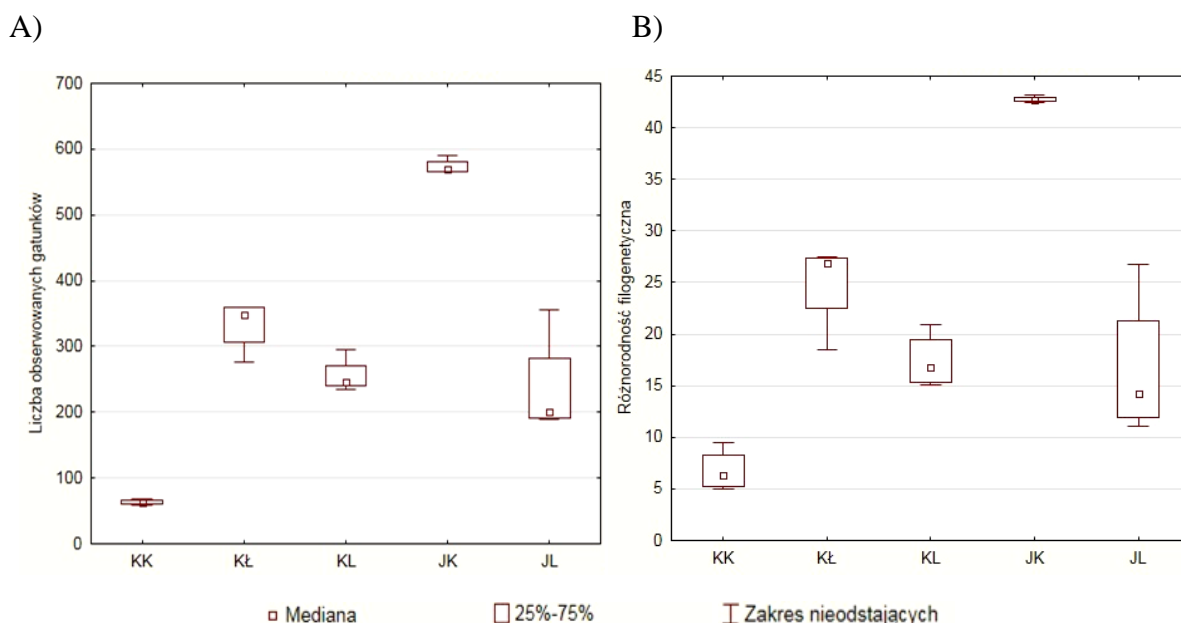


Rys. 14. Krzywe rarefakcji wykreślone na podstawie (A) całkowitej liczby OTU oraz (B) różnorodności filogenetycznej. Oznaczenia: KK (Komonica korzeń), KŁ (Komonica łodyga), KL (Komonica liść), JK (Jastrzębiec korzeń), JL (Jastrzębiec liść).

Liczba zidentyfikowanych OTU była najwyższa dla mikrobiomu JK i wynosiła  $573,18 \pm 10,13$ . W pozostałych próbach, wartości te były zdecydowanie niższe i wynosiły  $332,48 \pm 34,1$ ;  $255,8 \pm 23,6$ ;  $237,0 \pm 68,72$  i  $62,8 \pm 3,4$ , odpowiednio dla mikrobiomu KŁ, KL, JL i KK. Podobnie, skrajne wartości różnorodności filogenetycznej, stwierdzono dla JK oraz KK, które wynosiły odpowiednio  $42,78 \pm 0,28$  oraz  $6,8 \pm 1,77$ .

Rozproszenie wartości OTU i różnorodności filogenetycznej dla badanych prób przedstawiono na wykresach pudełkowych (Rys. 15). Największe rozproszenie wartości OTU uzyskano dla próby JL, a najmniejsze dla KK. Wyniki uzyskane dla różnorodności filogenetycznej dla JL i JK przyjmują odpowiednio najbardziej i najmniej różniące się wartości.

Indeks podobieństwa Gooda w badanych próbach był wyższy od 97%, co wskazuje na bardzo wysoki poziom reprezentatywności badanych prób, odzwierciedlający znaczną różnorodność gatunków bakterii obserwowaną w badanych próbach. Na podstawie wyznaczonych indeksów bioróżnorodności (Tabela 6), mikrobiom korzeni jastrzębca charakteryzuje się najwyższą, a mikrobiom korzeni komonicy najniższą bioróżnorodnością bakterii endofitycznych. Najwyższą różnorodnością gatunkową charakteryzuje się mikrobiom korzeni jastrzębca, najniższą mikrobiomy JL i KK, a średnią KŁ i KL.



Rys. 15. Rozproszenie wartości uzyskanych dla (A) liczby obserwowanych gatunków oraz (B) różnorodności filogenetycznej. Oznaczenia: KK (Komonica korzeń), KŁ (Komonica łodyga), KL (Komonica liść), JK (Jastrzębiec korzeń), JL (Jastrzębiec liść).

Tabela 6. Indeksy bioróżnorodności wyznaczone dla KK (Komonica korzeń), KŁ (Komonica łodyga), KL (Komonica liść), JK (Jastrzębiec korzeń), JL (Jastrzębiec liść).

Próby	Wartości indeksów bioróżnorodności			
	Chao1	Indeks Gooda	Indeks Shannona	Wskaźnik różnorodności Simpsona 1/D
KK	16,5±1,7d	99,7±0,6a	0,3±0,0d	1,1±0,0c
KŁ	71,7±4,1b	98,7±0,2c	3,3±0,0b	4,8±0,1b
KL	37,2±10,9c	99,6±0,3ab	3,0±0,2b	4,4±0,9b
JK	123,5±6,7a	97,7±0,3d	5,0±0,1a	15,5±2,6a
JL	40,8±3,9c	99,1±0,1b	1,2±0,5c	1,5±0,4c

Wartości porównywano kolumnami, a te oznaczone różnymi literami wykazują istotne statystycznie różnice (jednoczynnikowa ANOVA, test Tukeya,  $p < 0,05$ ).

Podczas przeprowadzonych analiz w sumie zidentyfikowano 129 różnych OTU, wśród których 74 zaklasyfikowano do rodzaju, a 55 do rodziny lub klasy (Tabela 7, 8, 9). Ze względu na różny procentowy udział jednostek taksonomicznych w badanych próbach, wybrano 28 OTU odpowiadających rodzinie lub klasie, które stanowiły  $\geq 1\%$  przynajmniej



w jednej badanej próbie (Tabela 7). Wśród mikrobiomu komonicy zwyczajnej zidentyfikowano 11 (korzeń), 56 (łodyga), 35 (liść) różnych OTU. Natomiast u jastrzębca wysokiego 106 (korzeń) oraz 38 (liść) różnych OTU.

Analiza otrzymanych sekwencji i ich klasyfikacja do odpowiednich jednostek taksonomicznych pozwoliła na wyróżnienie 11 typów (Tabela 8). Największy udział procentowy w badanych próbach miały *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* (*Alpha*-, *Beta*-, *Delta*-, *Gamma*-), *TM7* i *Tenericutes* (Rys. 16). *Proteobacteria* stanowiły, w zależności od tkanki, 42,9-99,9% wszystkich OTU zidentyfikowanych w mikrobiomie komonicy, natomiast dla jastrzębca udział tej klasy, w zależności od tkanki, mieścił się w granicach 11,9-39,6% wszystkich OTU. Kolejno, wyróżniono 10 rodzin, które występowały we wszystkich badanych próbach, a ich udział stanowił >1% przynajmniej w jednej z nich. Niezwykle wysoki udział rodzaju *Mesorhizobium* (>98%) obserwowano wśród mikrobiomu korzeni komonicy, natomiast ponad 80% OTU uzyskanych z liści jastrzębca nie udało się zidentyfikować do właściwej jednostki taksonomicznej (Rys. 17).

Mikrobiomy badanych roślin różnią się dominującymi typami/klasami (Tabela 9). W mikrobiomie korzeni komonicy, aż 98,8% otrzymanych sekwencji została zaklasyfikowana do *Alphaproteobacteria*. W mikrobiomie łodyg komonicy wykazano przewagę sekwencji reprezentujących *Alphaproteobacteria* (48,2%), natomiast w liściach komonicy dominowały OTU należące do *Firmicutes* (44,4%). Analiza rang taksonomicznych wykazała, że wśród bakterii tworzących mikrobiom korzeni jastrzębca najwyższy udział stanowiły szczepy zaliczane do *Actinobacteria*, których odsetek wynosił 44% wszystkich OTU. W przypadku liści tej rośliny tylko 7,8% OTU zostało przyporządkowane do *Gammaproteobacteria*, aż 83,6% OTU charakterystycznych dla liści jastrzębca nie zostało rozpoznanych i przypisanych do właściwej jednostki taksonomicznej.

Skład mikrobiomu badanych roślin różni się także na poziomie rodzaju. W tkankach komonicy niezwykle wysoki odsetek OTU został przyporządkowany do rodzaju *Mesorhizobium*, który stanowił odpowiednio w korzeniach 98,3%, a w łodygach tej rośliny 43,2% wszystkich oznaczonych OTU. Duży procentowy udział stanowiły także OTU klasyfikowane do rodzajów *Pseudomonas*, których udział w łodygach i liściach wynosił odpowiednio 20,5% oraz 21,4%. Ponadto, w liściach komonicy zidentyfikowano 37,4% OTU należących do rodzaju *Bacillus*.

Inaczej przedstawiała się analiza składu mikrobiomu jastrzębca wysokiego. W korzeniach OTU zaklasyfikowano do rodzaju *Streptomyces*, rzędu *Micromonosporaceae*, rodzaju *Pseudomonas*, odpowiednio 23,8%, 12,6%, 7,4% zidentyfikowanych OTU.

W liściach tej rośliny najwięcej OTU (83,6%) nie zostało przypisanych do żadnej jednostki taksonomicznej. Są to sekwencje niemające odpowiednika w bazie danych, którym nie przypisano żadnej rangi taksonomicznej. Pozostałe OTU przypisane do odpowiednich rodzajów *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, rodziny *Micromonosporaceae*, stanowiły odpowiednio 4,3%, 2,8% i 2,2% wszystkich OTU.

Niektóre z jednostek taksonomicznych zostały zidentyfikowane tylko wśród mikrobiomu jednej rośliny. Jedynie w łodygach komonicy zidentyfikowano rodzaj *Buchnera*. Natomiast charakterystyczne tylko dla mikrobiomu korzeni jastrzębca wysokiego są rodzaje *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Rhodanobacter*, *Asteroleplasma* oraz klasa TM7-3. Oprócz tego 6 rodzajów to jest: *Propionibacterium*, *Delftia*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Methylobacterium*, *Microbacterium* występowało w 4 badanych próbach KL, KŁ, JK, JL. Natomiast we wszystkich badanych próbach zidentyfikowano rodzaje: *Mesorhizobium*, *Morganella*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* i rodzinę *Oxalobacteraceae*.

Tabela 7. Udział procentowy wybranych OTU, które stanowiły  $\geq 1\%$  wśród mikrobiomu roślin komonicy zwyczajnej oraz jastrzębca wysokiego. Kolorem czerwonym zaznaczono OTU mające najwyższy procentowy udział wśród badanych prób. Rodzaj podkreślony podwójną linią, występuje tylko u komonicy, rodzaj/rodzina podkreślony pojedynczą linią, występuje tylko u jastrzębca.

Typ lub klasa	*-klasa **-rząd ***-rodzina	Próby				
		KK	KŁ	KL	JK	JL
		OTU %				
Nieprzypisane	-	0,00	0,00	0,10	1,45	83,6
Actinobacteria	Microbacterium	0,00	7,15	9,65	2,73	2,18
	Micromonosporaceae***	0,00	0,03	0,00	12,60	0,00
	Propionibacterium	0,00	0,85	1,68	0,20	0,45
	Streptomyces	0,00	0,15	0,00	23,78	0,05
Bacteroidetes	Chryseobacterium	0,00	0,08	0,00	4,73	0,00
Firmicutes	Bacillus	0,00	0,13	37,38	0,90	0,98
	Staphylococcus	0,00	0,35	5,50	0,10	0,10
Alphaproteobacteria	Caulobacter	0,00	0,20	0,00	1,13	0,03
	Rhizobiales**	0,00	0,03	1,88	0,03	0,00
	Methylobacterium	0,00	1,90	4,35	0,20	0,78
	Mesorhizobium	98,33	43,20	0,23	0,55	0,15
	Agrobacterium	0,10	0,80	0,00	1,18	0,03
	Rhizobium	0,00	0,00	0,00	1,43	0,00
Betaproteobacteria	Burkholderia	0,00	0,00	0,00	3,95	0,05
	Delftia	0,00	12,33	6,68	2,03	1,70
	Leptothrix	0,00	0,10	0,00	1,08	0,00
	Rubrivivax	0,00	0,65	0,00	2,80	0,05

	<i>Oxalobacteraceae</i> ***	0,05	0,40	0,58	1,00	0,53
	<i>Janthinobacterium</i>	0,03	0,10	0,00	2,38	0,08
<i>Gammaproteobacteria</i>	<u><i>Buchnera</i></u>	0,00	1,68	0,00	0,00	0,00
	<i>Morganella</i>	0,25	1,13	0,03	0,38	0,03
	<i>Acinetobacter</i>	0,00	0,00	5,18	2,68	2,85
	<i>Pseudomonas</i>	0,35	20,48	21,35	7,40	4,28
	<u><i>Rhodanobacter</i></u>	0,00	0,00	0,00	4,35	0,00
	<i>Stenotrophomonas</i>	0,38	1,30	0,85	0,58	0,58
TM7	<u>TM7-3*</u>	0,00	0,00	0,00	1,35	0,00
TM7	EW055**	0,00	0,15	0,00	1,63	0,00
<i>Tenericutes</i>	<u><i>Asteroleplasma</i></u>	0,00	0,00	0,00	2,88	0,00

Oznaczenia: KK (Komonica korzeń), KŁ (Komonica łodyga), KL (Komonica liść), JK (Jastrzębiec korzeń), JL (Jastrzębiec liść).

Tabela 8. Udział procentowy wybranych OTU, które stanowiły <1% wśród mikrobiomu roślin komonicy zwyczajnej oraz jastrzębca wysokiego. Kolorem czerwonym zaznaczono OTU mające najwyższy procentowy udział wśród badanych prób. Rodzaj podkreślony podwójną linią, występuje tylko u komonicy, rodzaj podkreślony pojedynczą linią, występuje tylko u jastrzębca.

Typ lub klasa	*-klasa **-rząd ***-rodzina	Próby				
		KK	KŁ	KL	JK	JL
		OTU %				
<i>Acidobacteria</i>	<u><i>Terriglobus</i></u>	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
<i>Actinobacteria</i>	<u><i>Acidimicrobiales</i></u> **	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
	<u><i>Actinomycetales</i></u> **	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00
	<u><i>Lentzea</i></u>	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
	<i>Actinotalea</i>	0,00	0,10	0,00	0,00	0,03
	<i>Corynebacterium</i>	0,00	0,00	0,43	0,00	0,03
	<u><i>Frankia</i></u>	0,00	0,00	0,00	0,40	0,00
	<u><i>Geodermatophilaceae</i></u> ***	0,00	0,03	0,00	0,00	0,00
	<u><i>Glycomyces</i></u>	0,00	0,00	0,00	0,15	0,00
	<u><i>Arsenicicoccus</i></u>	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
	<u><i>Janibacter</i></u>	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00
	<u><i>Kineosporiaceae</i></u> ***	0,00	0,00	0,00	0,85	0,00
	<i>Kineococcus</i>	0,00	0,10	0,03	0,03	0,18
	<u><i>Microbacteriaceae</i></u> ***	0,00	0,00	0,08	0,00	0,00
	<i>Microbacteriaceae</i> ***	0,00	0,13	0,00	0,45	0,08
	<u><i>Cryocola</i></u>	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00
	<i>Curtobacterium</i>	0,00	0,00	0,05	0,08	0,05
	<u><i>Herbiconiux</i></u>	0,00	0,00	0,13	0,00	0,00
	<i>Salinibacterium</i>	0,00	0,00	0,13	0,58	0,05
	<i>Micrococcaceae</i> ***	0,00	0,20	0,00	0,00	0,15
	<u><i>Rothia</i></u>	0,00	0,00	0,18	0,00	0,00
	<u><i>Micromonosporaceae</i></u> ***	0,00	0,00	0,00	0,18	0,00
	<u><i>Couchioplanes</i></u>	0,00	0,00	0,00	0,73	0,00
	<u><i>Mycobacterium</i></u>	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00

	<i>Nocardiaceae</i> ***	0,00	0,03	0,05	0,03	0,03
	<i>Nocardiodaceae</i> ***	0,00	0,00	0,00	0,05	0,03
	<i>Aeromicrobium</i>	0,00	0,00	0,00	0,45	0,00
	<i>Kribbella</i>	0,00	0,03	0,00	0,15	0,00
	<i>Pseudonocardiaceae</i> ***	0,00	0,00	0,00	0,18	0,00
	<i>Amycolatopsis</i>	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00
	<i>Streptomycetaceae</i> ***	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00
	<i>Gaiellales</i> **	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Cytophagaceae</i> ***	0,00	0,43	0,00	0,15	0,00
	<i>Hymenobacter</i>	0,00	0,03	0,00	0,00	0,13
	<i>Flavobacteriaceae</i> ***	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00
	<i>Flavobacterium</i>	0,00	0,00	0,00	0,50	0,00
	<i>Sphingobacteriaceae</i> ***	0,00	0,05	0,00	0,05	0,00
	<i>VC2_1_Bac22</i> *	0,00	0,00	0,00	0,28	0,00
	<i>Chitinophagaceae</i> ***	0,00	0,00	0,00	0,70	0,00
	<i>Chitinophagaceae</i> ***	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
	<i>Chitinophaga</i>	0,00	0,00	0,00	0,18	0,00
	<i>Niabella</i>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,05
<i>Chlamydiae</i>	<i>Criblamydiaceae</i> ***	0,00	0,00	0,10	0,00	0,00
	<i>Parachlamydiaceae</i> ***	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
	<i>Protochlamydia</i>	0,00	0,03	0,00	0,03	0,00
<i>Chloroflexi</i>	<i>Chloroflexi</i> *	0,00	0,00	0,00	0,40	0,00
	<i>Dolo</i> ***	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00
<i>Firmicutes</i>	<i>Bacilli</i> *	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00
	<i>Bacillales</i> **	0,00	0,00	0,20	0,00	0,00
	<i>Thermicanus</i>	0,00	0,08	0,00	0,00	0,05
	<i>Aerococcus</i>	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00
	<i>Vagococcus</i>	0,00	0,00	0,38	0,00	0,00
	<i>Lactococcus</i>	0,00	0,00	0,08	0,03	0,00
	<i>Streptococcus</i>	0,00	0,00	0,75	0,10	0,00
	<i>Anaerococcus</i>	0,00	0,00	0,05	0,00	0,00
<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacteriaceae</i> ***	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
<i>Planctomycetes</i>	<i>DH61</i> **	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
<i>Proteobacteria</i>	-	0,00	0,15	0,00	0,03	0,00
<i>Proteobacteria</i>	<i>Alphaproteobacteria</i> *	0,00	0,03	0,03	0,20	0,15
	<i>BD7-3</i> **	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00
	<i>Aurantimonadaceae</i> ***	0,00	0,25	0,00	0,03	0,00
	<i>Bradyrhizobium</i>	0,00	0,23	0,00	0,60	0,03
	<i>Ochrobactrum</i>	0,00	0,00	0,30	0,03	0,00
	<i>Hyphomicrobium</i>	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00
	<i>Rhodoplanes</i>	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
	<i>Methylobacteriaceae</i> ***	0,00	0,00	0,00	0,00	0,08
	<i>Phyllobacteriaceae</i> ***	0,38	0,20	0,00	0,00	0,00
	<i>Rhizobiaceae</i> ***	0,03	0,18	0,00	0,13	0,00
	<i>Rickettsia</i>	0,00	0,05	0,00	0,03	0,00
	<i>Erythrobacteraceae</i> ***	0,00	0,05	0,00	0,03	0,00
	<i>Sphingomonadaceae</i> ***	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00
	<i>Sphingomonas</i>	0,00	0,98	0,00	0,43	0,43

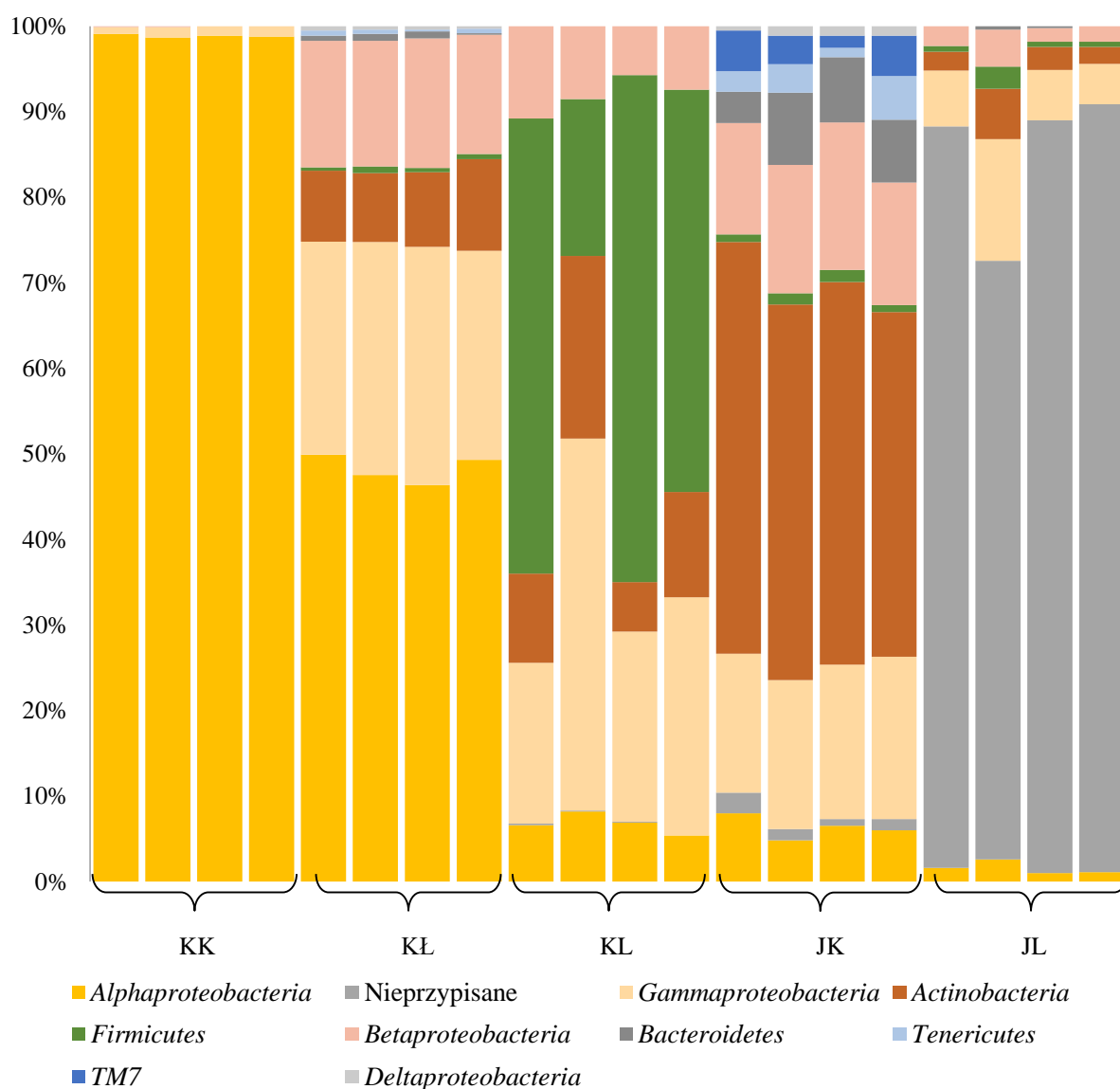
<i>Betaproteobacteria</i>	<u><i>Burkholderiales</i>**</u>	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
	<u><i>Alcaligenaceae</i>***</u>	0,00	0,00	0,00	0,18	0,00
	<i>Glomeribacter</i>	0,00	0,00	0,00	0,33	0,00
	<i>Comamonadaceae</i> ***	0,00	0,53	0,53	0,33	0,00
	<i>Methylibium</i>	0,00	0,05	0,00	0,35	0,00
	<i>Schlegelella</i>	0,00	0,05	0,13	0,08	0,03
	<u><i>Oxalobacteraceae</i>***</u>	0,00	0,00	0,00	0,13	0,00
	<i>Paucimonas</i>	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
	<i>Ralstonia</i>	0,00	0,00	0,23	0,05	0,00
	<u><i>Ellin6067</i>**</u>	0,00	0,05	0,00	0,00	0,00
	<i>Dechloromonas</i>	0,00	0,30	0,00	0,05	0,13
	<u><i>SC-I-84</i>**</u>	0,00	0,00	0,00	0,10	0,00
<i>Deltaproteobacteria</i>	<u><i>Bdellovibrio</i></u>	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
	<u><i>Myxococcales</i>**</u>	0,00	0,00	0,00	0,73	0,00
	<u><i>Cystobacterineae</i>***</u>	0,00	0,00	0,00	0,20	0,00
	<u><i>Haliangiaceae</i>***</u>	0,00	0,38	0,00	0,03	0,00
<i>Gammaproteobacteria</i>	<i>Enterobacteriaceae</i> ***	0,00	0,93	0,60	0,03	0,05
	<i>Pantoea</i>	0,00	0,08	0,00	0,13	0,00
	<u><i>Serratia</i></u>	0,00	0,00	0,00	0,08	0,00
	<i>Azomonas</i>	0,00	0,00	0,03	0,08	0,00
	<u><i>Sinobacteraceae</i>***</u>	0,00	0,00	0,00	0,45	0,00
	<i>Steroidobacter</i>	0,03	0,18	0,00	0,75	0,00
	<u><i>Dokdonella</i></u>	0,00	0,00	0,00	0,35	0,00
	<u><i>Fulvimonas</i></u>	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
	<i>Pseudoxanthomonas</i>	0,05	0,18	0,05	0,38	0,03
	<u><i>Thermomonas</i></u>	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
<i>TM7</i>	-	0,00	0,20	0,00	0,03	0,00
<i>TM7</i>	<u><i>I025</i>**</u>	0,00	0,10	0,00	0,00	0,00
<i>Tenericutes</i>	<u><i>Mollicutes</i>*</u>	0,00	0,00	0,00	0,68	0,00

Oznaczenia: KK (Komonica korzeń), KŁ (Komonica łodyga), KL (Komonica liść), JK (Jastrzębiec korzeń), JL (Jastrzębiec liść).

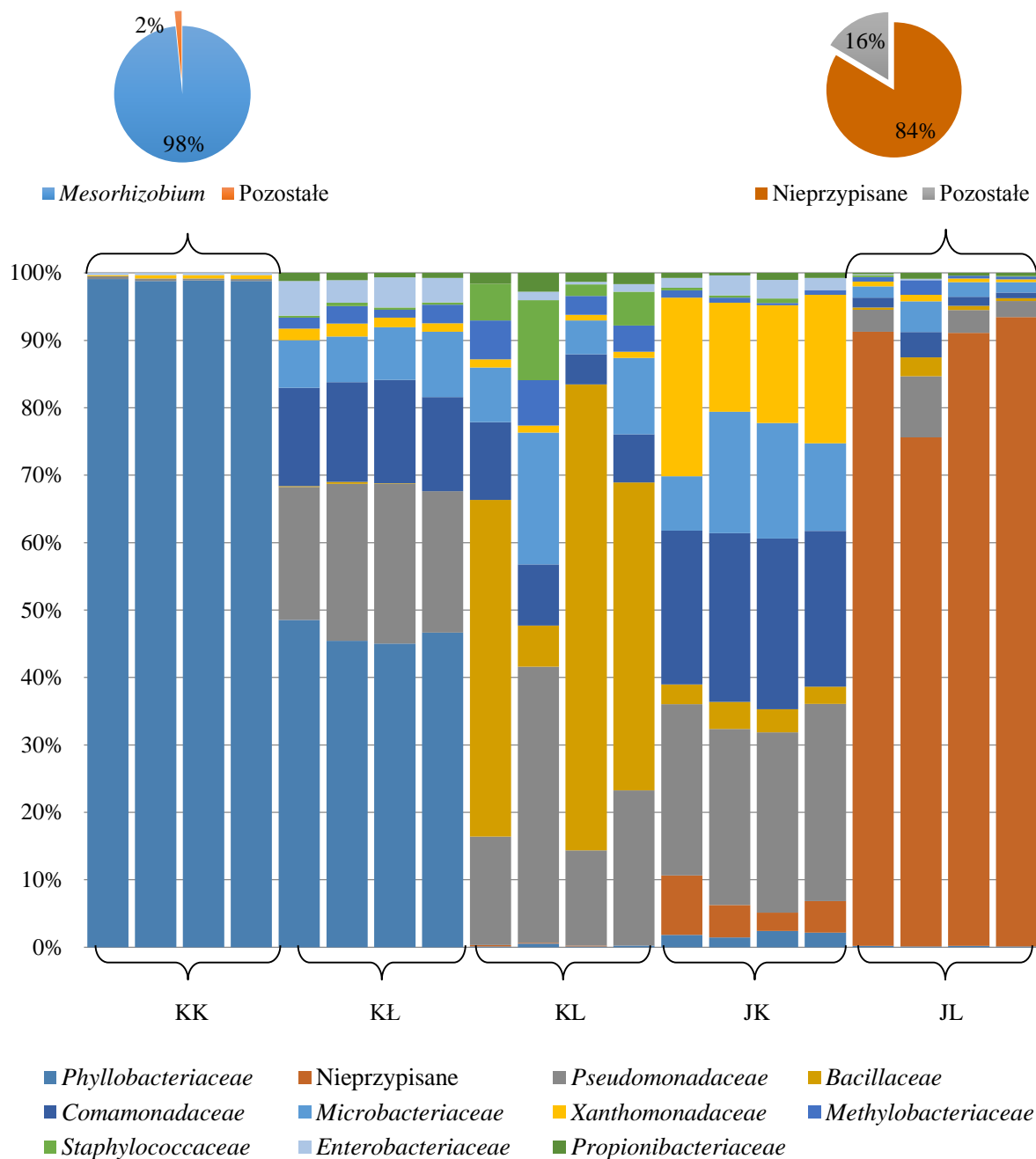
Tabela 9. Udział procentowy wszystkich typów/klas zidentyfikowanych dla badanych zespołów bakterii endofitycznych roślin komonicy i jastrzębca. Kolorem czerwonym zaznaczono OTU mające najwyższy procentowy udział wśród badanych prób.

Typ/Klasa	Próby				
	KK	KŁ	KL	JK	JL
	OTU %				
Nieprzypisane	0,00	0,00	0,10	1,45	83,60
<i>Acidobacteria</i>	0,00	0,00	0,00	0,03	0,00
<i>Actinobacteria</i>	0,00	8,93	12,45	44,03	3,20
<i>Bacteroidetes</i>	0,00	0,60	0,00	6,73	0,15
<i>Chlamydiae</i>	0,00	0,05	0,10	0,08	0,00
<i>Chloroflexi</i>	0,00	0,05	0,00	0,40	0,00
<i>Firmicutes</i>	0,00	0,58	44,43	1,10	1,13
<i>Fusobacteria</i>	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
<i>Planctomycetes</i>	0,00	0,00	0,00	0,05	0,00
<i>Proteobacteria</i>	99,98	89,33	42,93	39,65	11,93
<i>TM7</i>	0,00	0,45	0,00	2,98	0,00
<i>Tenericutes</i>	0,00	0,00	0,00	3,53	0,00
<i>Alphaproteobacteria</i>	98,83	48,15	6,78	6,30	1,58
<i>Betaproteobacteria</i>	0,05	14,60	8,10	14,83	2,50
<i>Deltaproteobacteria</i>	0,00	0,40	0,00	0,95	0,00
<i>Gammaproteobacteria</i>	1,08	26,03	28,05	17,58	7,83

Oznaczenia: KK (Komonica korzeń), KŁ (Komonica łodyga), KL (Komonica liść), JK (Jastrzębiec korzeń), JL (Jastrzębiec liść).



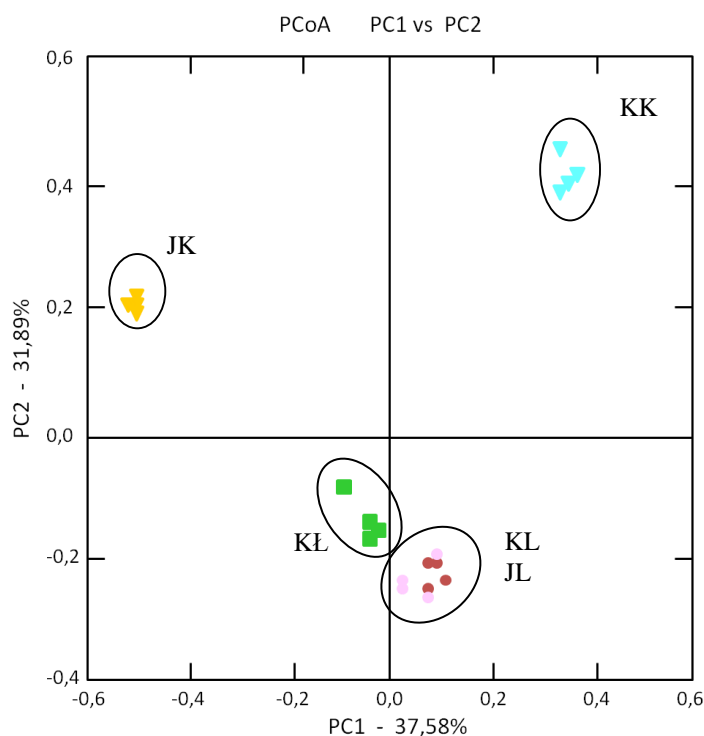
Rys. 16. Udział procentowy dominujących typów/klas zidentyfikowanych wśród mikrobiomu komonicy zwyczajnej i jastrzębca wysokiego. Typ *Proteobacteria* został przedstawiony jako klasy *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*- oraz *Deltaproteobacteria*. Oznaczenia: KK (Komonica korzeń), KŁ (Komonica łodyga), KL (Komonica liść), JK (Jastrzębiec korzeń), JL (Jastrzębiec liść).



Rys. 17. Udział procentowy dominujących rodzin zidentyfikowanych wśród mikrobiomu komonicy zwyczajnej i jastrzębca wysokiego. Wykresy kołowe dotyczą struktury mikrobiomu dla prób KK oraz JK i przedstawiają dominujące OTU przypisane do rodzaju. Oznaczenia: KK (Komonica korzeń), KŁ (Komonica łodyga), KL (Komonica liść), JK (Jastrzębiec korzeń), JL (Jastrzębiec liść).



W celu określenia stopnia podobieństwa badanych prób przeprowadzono analizę głównych współrzędnych PCoA zgodnie z metrykami Unweighted (analiza jakościowa) oraz Weighted (analiza ilościowa) UniFrac. Metoda PCoA (Unweighted UniFrac) została wykorzystana do wyznaczenia wzorców zmienności oraz różnic między badanymi próbami wynikającymi z obecności lub braku danej grupy taksonomicznej (Rys. 18).

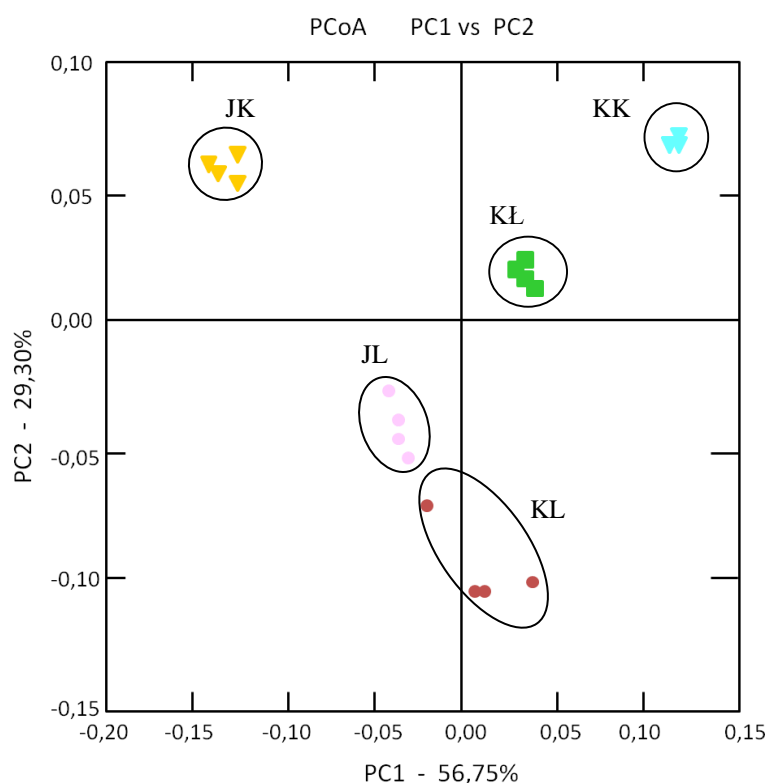


Rys. 18. PCoA (Unweighted UniFrac) dla mikrobiomu komonicy zwyczajnej oraz jastrzębca wysokiego. Oznaczenia: KK (Komonica korzeń), KŁ (Komonica łodyga), KL (Komonica liść), JK (Jastrzębiec korzeń), JL (Jastrzębiec liść). Analizę wykonano w oparciu o  $n=4$  (niewidoczność niektórych znaczników spowodowana jest ich zachodzeniem na siebie).

Wykonana analiza PCoA wyjaśnia 69,47% występującej zmienności między zespołami bakterii endofitycznych komonicy zwyczajnej i jastrzębca wysokiego ocenionej pod względem grup taksonomicznych reprezentowanych przez OTU. Pierwsza główna składowa (czynniki PC1) wyjaśnia 37,58% zmienności i różnicuje profile według różnorodności zidentyfikowanych OTU. Metoda PCoA wskazała na podobieństwo zespołów bakterii endofitycznych liści komonicy (KL) i jastrzębca (JL) (Rys. 18). Uzyskane grupy taksonomiczne tworzyły jeden klastery, który różnicował się od pozostałych zarówno względem czynnika PC1, jak i PC2. Najbardziej różnią się od siebie, pod względem bioróżnorodności grup taksonomicznych, zespoły bakterii endofitycznych występujące w korzeniach komonicy (KK) oraz jastrzębca (JK). Profile te są zróżnicowane względem

czynnika PC1. Wartości czynnika PC1 dla mikrobiomu korzeni jastrzębca przyjmują wartości ujemne, a dla mikrobiomu korzeni komonicy wartości dodatnie.

Metoda PCoA (Weighted UniFrac) uwzględnia różnice w liczebności każdej grupy taksonomicznej w badanych próbach (analiza ilościowa) (Rys. 19). PCoA (Weighted UniFrac) wykazała różnice między liczebnością grup taksonomicznych występujących wśród mikrobiomu komonicy zwyczajnej i jastrzębca wysokiego. Analiza PCoA wyjaśnia 86,05% zmienności obserwowanej między profilami badanych prób. Pierwsza główna składowa-czynnik PC1 wyjaśnia 56,75% zmienności i różnicuje próby ze względu na liczbę OTU zidentyfikowanych dla danej próby. Najbardziej różnią się od siebie zespoły bakterii endofitycznych występujące w korzeniach komonicy (KK) oraz jastrzębca (JK). Profile te zróżnicowane są względem czynnika PC1. Wartości czynnika PC1 dla prób JK przyjmują wartości ujemne, a dodatnie dla próby KK. Z kolei PC2 różnicuje otrzymane profile ze względu na części rośliny, z których je uzyskano. Próby grupują się w klastry ze względu na rodzaj tkanki z której izolowano endofity (Rys. 19).



Rys. 19. PCoA (Weighted UniFrac) dla mikrobiomu komonicy zwyczajnej oraz jastrzębca wysokiego. Oznaczenia: KK (Komonica korzeń), KŁ (Komonica łodyga), KL (Komonica liść), JK (Jastrzębiec korzeń), JL (Jastrzębiec liść). Analizę wykonano w oparciu o n=4 (niewidoczność niektórych znaczników spowodowana jest ich zachodzeniem na siebie).

## 4.8. Doświadczenie fitoremediacyjne

### 4.8.1. Oznaczenie zawartości TPH w glebie

Początkowe stężenie TPH w glebie wykorzystanej w doświadczeniu doniczkowym było wysokie i wynosiło  $12853,34 \pm 322,62 \text{ mg kg}^{-1}$  s.m. gleby. Analiza stężeń TPH w glebie po 75 dniach doświadczenia wykazała, że inokulacja gleby i nasion wybranymi szczepami bakterii endofitycznych zwiększa efektywność fitoremediacji. Jakkolwiek, obserwowany wynik w sposób istotny zależał od sposobu wprowadzenia szczepów, to jest od metody ich inokulacji: inokulacji gleby (SI) lub pre-inokulacji nasion z inokulacją gleby (PI). W układach, w których zastosowano metodę PI, obserwowano istotne statystycznie obniżenie stężenia TPH w glebie dla wszystkich badanych układów (PI+5WK; PI+10WK; PI+5WK+10WK) (Tabela 10). Najwyższy spadek stężenia TPH w glebie, o 19,1% w porównaniu do początkowej zawartości oleju mineralnego w glebie, zaobserwowano w przypadku zastosowania pre-inokulacji nasion z inokulacją gleby (PI), przez konsorcjum szczepów (PI+5WK+10WK) (Tabela 10).

W układzie doświadczalnym, w którym zastosowano tylko inokulację gleby przez konsorcjum szczepów (SI+5WK+10WK), zanotowano nieistotny statystycznie spadek stężenia TPH o 2,1%. Podobnie, ubytek TPH w glebie, do której nie wprowadzano inokulum bakteryjnego, w układach (S) i (R), wynosił odpowiednio 1,7% oraz 4,7% i był nieistotny statystycznie w odniesieniu do początkowej zawartości oleju mineralnego. Obecność roślin nie wpływała istotnie na obniżenie stężenia węglowodorów w glebie.

W celu określenia wpływu metody inokulacji (SI, PI) i szczepu/konsorcjum bakterii (5WK, 10WK, 5WK+10WK), na ubytek TPH, wykonano dwuczynnikową analizę wariancji. Analiza ta wykazała, że zastosowana metoda inokulacji bakterii miała istotny statystycznie wpływ na obserwowany spadek stężenia TPH w glebie ( $p < 0,001$ ). Metoda introdukcji szczepów (inokulacja gleby (SI) lub pre-inokulacja nasion z inokulacją gleby (PI)) wyjaśnia 72,5% obserwowanych zmian zawartości TPH w glebie w badanych układach doświadczalnych. Także wariant zastosowanego szczepu/konsorcjum bakterii jest istotnym czynnikiem ( $p < 0,001$ ), który wyjaśnia 16% obserwowanych różnic w koncentracji TPH w glebie. Natomiast, interakcje występujące między metodą, a zastosowanym szczepem/konsorcjum, wyjaśniają tylko 7,3% obserwowanych różnic w procentowym ubytku TPH w glebie ( $p = 0,002$ ).

Tabela 10. Ubytek zawartości (%) TPH w glebie po przeprowadzonej fitoremediacji (75 dzień doświadczenia).

Zawartość TPH w badanej glebie	
Układy doświadczalne	Ubytek TPH (%)
SI +5WK	0
SI +10WK	0
SI +5WK+10WK	2,1±1,8
PI+5WK	8,9±2,6*
PI+10WK	9,7±1,3*
PI+5WK+10WK	19,1±2,5*
S	1,7±0,5
R	4,7±1,4

Średnia procentowa wartość ubytku TPH±odchylenie standardowe z trzech powtórzeń

[\*] istotny statystycznie ubytek w odniesieniu do początkowej koncentracji TPH w badanej glebie (jednoczynnikowa ANOVA; test Tukeya  $p<0,05$ ).

#### 4.8.2. Ocena przeżywalności wprowadzonych bakterii endofitycznych

W celu oceny zdolności badanych szczepów do przeżywania w glebie i życicy trwałej, przeprowadzono izolację inokulantów z gleby i tkanek roślin (korzeni i części nadziemnych) na podłożu LB z dodatkiem rifampicyny.

Oba szczepy bakterii endofitycznych, *Rhodococcus erythropolis* 5WK<sup>rif</sup> oraz *Rhizobium* sp. 10WK<sup>rif</sup>, były zdolne do przeżywania w glebie i tkankach życicy. Podczas inokulacji gleby szczepem 5WK<sup>rif</sup> (SI+5WK) jego liczebność w korzeniach życicy była o rząd wielkości wyższa niż w częściach nadziemnych (Tabela 11). Natomiast, w glebie nie wykryto komórek szczepu 5WK<sup>rif</sup>. W przypadku szczepu 10WK<sup>rif</sup> (SI+10WK), wysoką liczbę komórek tej bakterii stwierdzono w glebie, przy jednoczesnym braku komórek tego szczepu w tkankach życicy. Po wprowadzeniu konsorcjum szczepów (SI+5WK+10WK) liczebność obu szczepów endofitycznych była o dwa rzędy wielkości wyższa w korzeniach niż w glebie (Tabela 11).

Przy pre-inokulacji nasion z inokulacją gleby szczepem 5WK<sup>rif</sup> (PI+5WK) jego komórki wyizolowano jedynie z korzeni życicy trwałej. Natomiast, liczebność bakterii 10WK<sup>rif</sup> (PI+10WK) w korzeniach i częściach nadziemnych życicy była porównywalna i wynosiła około  $6,04 \times 10^4$  j.t.k. g<sup>-1</sup> ś.m. tkanki życicy. Niemniej jednak, liczba komórek tego szczepu w korzeniach była istotnie statystycznie ( $p<0,05$ ) niższa niż endofitów 5WK<sup>rif</sup>.

Po wprowadzeniu konsorcjum szczepów (PI+5WK+10WK), komórki obu bakterii opornych na rifampicynę wyizolowano z gleby i korzeni, przy czym w korzeniach ich liczebność była istotnie statystycznie ( $p<0,05$ ) niższa niż w glebie (Tabela 11).

Przy bezpośrednim wprowadzeniu szczepu 5WK<sup>rif</sup> do gleby (SI+5WK) jego obecność stwierdzono w korzeniach i częściach nadziemnych, ale nie w glebie. Obecność szczepu 10WK<sup>rif</sup> zaobserwowano jedynie w glebie (SI+10WK). Natomiast, podczas zastosowania pre-inokulacji (PI+5WK), obecność 5WK<sup>rif</sup> stwierdzono tylko wewnątrz korzeni. Szczep 10WK<sup>rif</sup> wykazywał zdolność do kolonizacji korzeni i części nadziemnych życicy (PI+10WK). Po wprowadzeniu szczepów w postaci konsorcjum (SI+5WK+10WK; PI+5WK+10WK), ich komórki wykryto w glebie i korzeniach życicy.

W celu określenia różnic między liczebnością szczepów w glebie, korzeniach i częściach nadziemnych życicy trwałej przeprowadzono jednoczynnikową analizę wariancji (Tabela 11). Analiza post-hoc (test Tukeya,  $p<0,05$ ) wykazała, że w przypadku porównania liczebności bakterii w glebie, uzyskane wartości istotnie różnią się od siebie. W przypadku korzeni, liczebność komórek bakterii wprowadzonych w postaci konsorcjum (SI+5WK+10WK; PI+5WK+10WK) istotnie statystycznie różniła się od siebie. Analiza post-hoc (test Tukeya,  $p<0,05$ ) nie wykazała istotnych statystycznie różnic w liczebności komórek bakterii w częściach nadziemnych.

Tabela 11. Liczebność bakterii endofitycznych w glebie oraz tkankach życicy trwałej w 75 dniu doświadczenia.

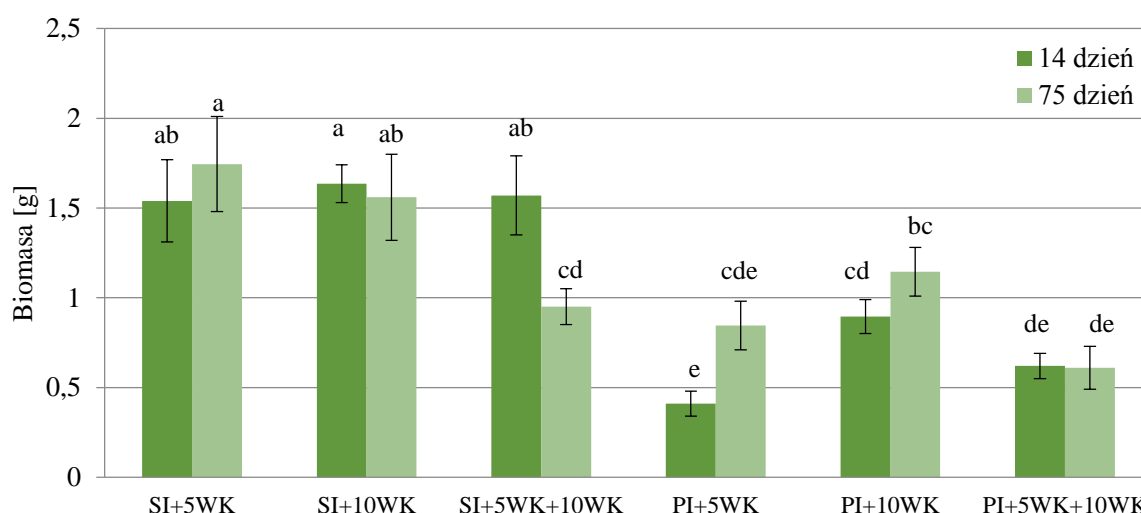
Układy doświadczalne	Liczebność bakterii endofitycznych		
	Gleba (log j.t.k. g <sup>-1</sup> s.m. gleby)	Korzeń (log j.t.k. g <sup>-1</sup> ś.m. korzeni)	Części nadziemne (log j.t.k. g <sup>-1</sup> ś.m. części nadziemnych)
SI+5WK	0	5,84±0,08bc	4,84±0,18cde
SI+10WK	8,34±0,12a	0	0
SI+5WK+10WK	4,56±0,28e	6,55±0,07b	0
PI+5WK	0	5,94±0,52b	0
PI+10WK	0	4,72±0,12de	4,8±0,17de
PI+5WK+10WK	5,7±0,05bcd	4,48±0,21e	0

Liczebność bakterii endofitycznych±odchylenie standardowe z trzech powtórzeń; Wartości oznaczone różnymi literami wykazują istotne statystycznie różnice (jednoczynnikowa ANOVA, test Tukeya,  $p<0,05$ ).

### 4.8.3. Wpływ introdukowanych szczepów bakterii na biomasę roślin

Metoda inokulacji szczepów, to jest inokulacja gleby (SI) lub pre-inokulacja nasion z inokulacją gleby (PI), w znaczący sposób wpływała na uzyskaną biomasę roślin podczas fitoremediacji (trójczynnikowa ANOVA,  $p < 0,001$ ). Podczas inokulacji gleby (SI) zaobserwowano przyrost biomasy życicy jedynie w przypadku wprowadzenia szczepu 5WK, gdzie współczynnik wzrostu wyniósł 13,3% (SI+5WK). Przy zastosowaniu metody pre-inokulacji nasion z inokulacją gleby (PI) obserwowano przyrost biomasy roślin dla układów doświadczalnych, w których przeprowadzono inokulację pojedynczymi szczepami 5WK (PI+5WK), 10WK (PI+10WK) (Rys. 20). Współczynnik wzrostu roślin obliczony dla tych układów wynosił odpowiednio 106,1% (PI+5WK) oraz 28% (PI+10WK).

W celu określenia wpływu czasu, metody inokulacji bakterii (SI, PI) i szczepu/konsorcjum bakterii (5WK, 10WK, 5WK+10WK), na przyrost biomasy życicy trwałej, wykonano trójczynnikową analizę wariancji. Analiza ta wykazała, że zastosowana metoda inokulacji bakterii endofitycznych (inokulacja gleby (SI) lub pre-inokulacja nasion z inokulacją gleby (PI)) miała istotny statystycznie wpływ na obserwowany wzrost biomasy życicy w badanych układach doświadczalnych ( $p < 0,001$ ). Metoda introdukcji szczepów wyjaśnia 64% obserwowanych zmian. Również, wariant zastosowanego szczepu/konsorcjum bakterii jest istotnym czynnikiem ( $p < 0,001$ ), który wyjaśnia 10,6% obserwowanych różnic w biomacie roślin.



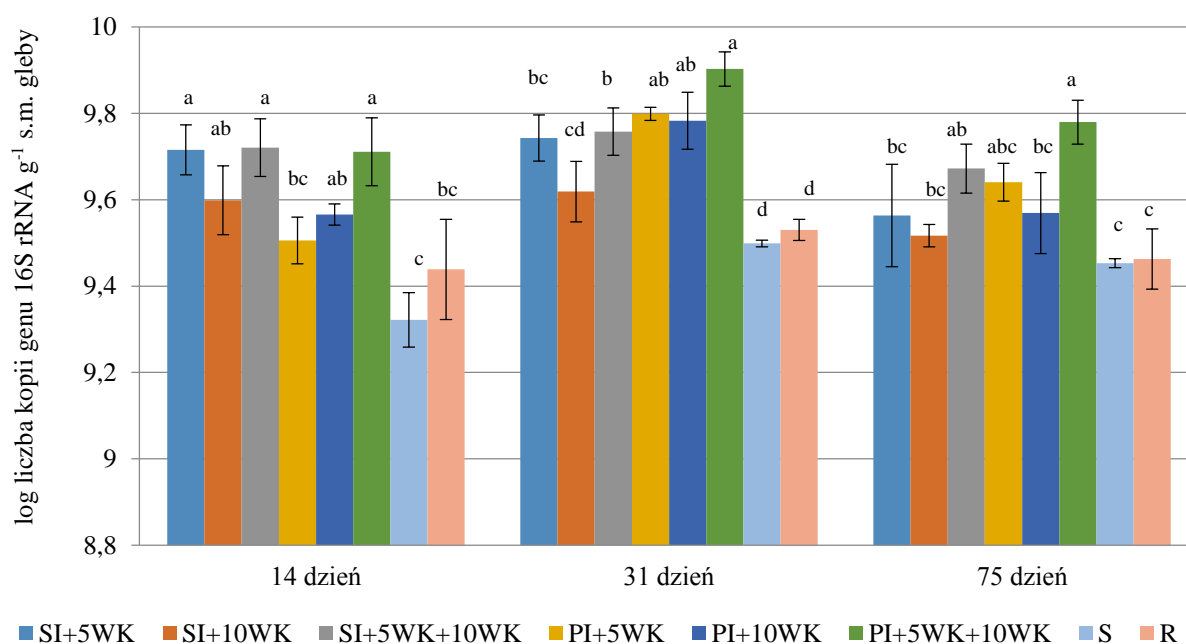
Rys. 20. Biomasa życicy trwałej inokulowanej bakteriami endofitycznymi w 14 i 75 dniu fitoremediacji. Różnymi literami oznaczono istotne statystycznie różnice biomasy roślin (jednoczynnikowa ANOVA, test Tukeya,  $p < 0,05$ ).

#### 4.8.4. Określenie wpływu wprowadzonych szczepów na ogólną liczebność i liczebność bakterii zdolnych do rozkładu węglowodorów alifatycznych w glebie

W celu określenia wpływu introdukowanych szczepów endofitycznych na ogólną liczebność autochtonicznych bakterii i liczebność bakterii rozkładających alkany w glebie w 14, 31 i 75 dniu eksperymentu, zastosowano metodę real-time PCR, przy pomocy której przeprowadzono amplifikację fragmentów genów 16S rRNA i *alkH*.

Na podstawie zmian liczby kopii genu 16S rRNA w glebie poddanej fitoremediacji określano wpływ introdukowanych szczepów na zespół mikroorganizmów autochtonicznych obecnych w glebie. W celu określenia różnic w liczbie kopii genu 16S rRNA w glebie między badanymi układami w danym dniu przeprowadzenia odczytu wykonano jednoczynnikową analizę wariancji oraz test Tukeya,  $p < 0,05$ . Wyniki analizy post-hoc przedstawiono na Rys. 21. Analiza ta wykazała, że w 14, 31 i 75 dniu doświadczenia nie występują istotne statystycznie różnice w średniej liczbie kopii genu 16S rRNA w glebach nieinokulowanych bakteriami (R oraz S). Wynika z tego, że zarówno obecność rośliny (R), jak i zachodzenie procesu naturalnej attenuacji (S), nie wpływało na zmianę liczby kopii genu 16S rRNA w żadnym z punktów pomiarowych. Ponadto w każdym dniu przeprowadzenia odczytu wykazano istotne statystycznie różnice w liczbie kopii genu 16S rRNA między glebą, w której rosły rośliny nieinokulowane bakteriami (R), a glebą w której rosły rośliny i wprowadzono konsorcjum szczepów (SI+5WK+10WK; PI+5WK+10WK) (Rys.21).

Przeprowadzona na podstawie liczby kopii genu 16S rRNA w badanej glebie trójczynnikowa ANOVA (czas, metoda inokulacji (SI, PI), szczep/konsorcjum bakterii jako czynniki) nie wykazała istotnej interakcji między tymi trzema czynnikami ( $p = 0,326$ ). Za 30%, 26,9%, 2,7% obserwowanych różnic w liczbie kopii genu 16S rRNA odpowiadają odpowiednio czas ( $p < 0,001$ ), szczep/konsorcjum bakterii ( $p < 0,001$ ) oraz metoda inokulacji szczepów ( $p < 0,05$ ). Analiza ta wykazała także istnienie interakcji między czasem a metodą wprowadzania szczepów do gleby ( $p < 0,001$ ) oraz metodą introdukcji bakterii a szczepem/konsorcjum bakterii ( $p = 0,037$ ), które wyjaśniają odpowiednio 14% oraz 3,8% występujących zmienności w liczbie kopii genu 16S rRNA w glebie w badanych układach doświadczalnych.



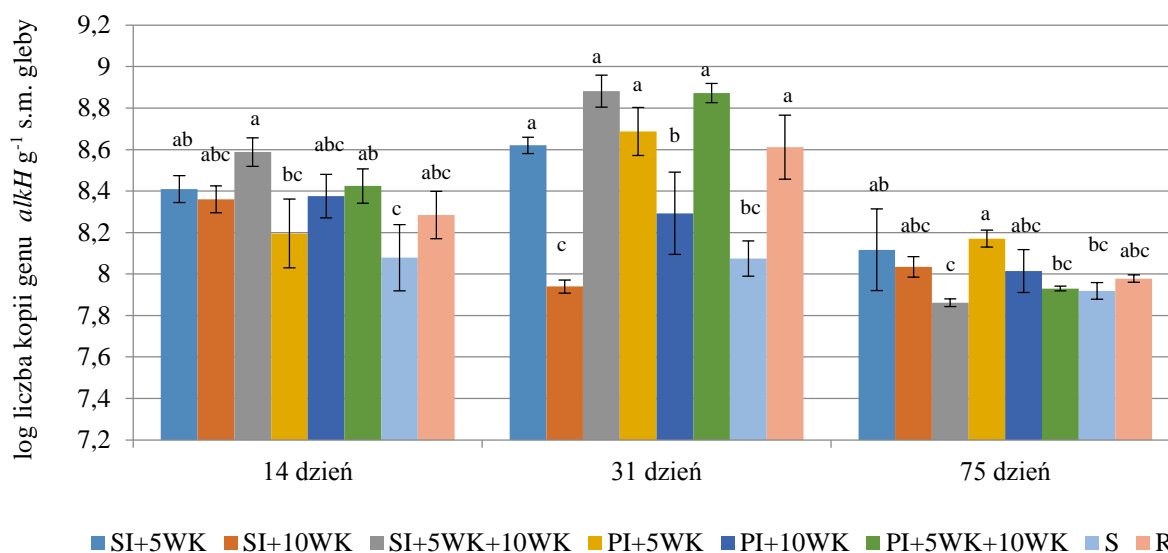
Rys. 21. Liczba kopii genu 16S rRNA w glebie w 14, 31 i 75 dniu doświadczenia. Wartości oznaczone różnymi literami są istotnie statystycznie różne względem badanych układów w danym dniu przeprowadzenia odczytu (jednoczynnikowa ANOVA dla poszczególnych dni, test Tukeya,  $p < 0,05$ ).

Na podstawie zmian liczby kopii genu *alkH* w glebie poddanej fitoremediacji określano wpływ introdukowanych szczepów na liczebność mikroorganizmów autochtonicznych zdolnych do rozkładu węglowodorów alifatycznych. W celu określenia różnic w liczbie kopii genu *alkH* w glebie, między badanymi układami, w danym dniu doświadczenia, wykonano jednoczynnikową analizę wariancji oraz test Tukeya ( $p < 0,05$ ). Wyniki analizy post-hoc przedstawiono na Rys. 22. Analiza ta wykazała, że w 14 i 75 dniu doświadczenia nie występują istotne statystycznie różnice w średniej liczbie kopii genu *alkH* między glebą, w której rosły rośliny (R) oraz glebą bez posianych roślin (S) (Rys.22). Natomiast w 75 dniu doświadczenia fitoremediacyjnego nie zaobserwowano istotnych różnic w liczbie kopii genu *alkH* w glebie pomiędzy układami doświadczalnymi.

W celu określenia wpływu czasu, metody inokulacji bakterii i szczepu/konsorcjum bakterii na zmiany liczby kopii genu *alkH* w badanej glebie, przeprowadzono trójczynnikową analizę wariancji. Nie wykazano istotnej interakcji tych trzech czynników ( $p = 0,069$ ). Największy wpływ na zmiany liczby kopii genu *alkH* miał czas ( $p < 0,001$ ), który wyjaśniał 48,4% obserwowanej zmienności, następnie zastosowany szczep/konsorcjum bakterii



( $p < 0,001$ ) wyjaśniający 11,9% występujących różnic w liczbie kopii genu *alkH*. Analiza ta wykazała także istnienie interakcji między czasem, a szczepem/konsorcjum bakterii ( $p < 0,001$ ), która wyjaśnia 27,5% występujących zmienności w liczbie kopii genu *alkH* w glebie w badanych układach doświadczenia.



Rys. 22. Liczba kopii genu *alkH* w glebie w 14, 31 i 75 dniu doświadczenia. Wartości oznaczone różnymi literami są istotnie statystycznie różne względem badanych układów w danym dniu przeprowadzenia odczytu (jednoczynnikowa ANOVA dla poszczególnych dni, test Tukeya,  $p < 0,05$ ).

## V. Dyskusja

### 5.1. Bioróżnorodność zespołów bakterii endofitycznych frakcji hodowalnej i niehodowalnej roślin narażonych na wysokie stężenie związków ropopochodnych w glebie

Bakterie endofityczne występują wewnątrz komórek roślinnych i/lub w przestrzeniach międzykomórkowych każdej z blisko 300 000 obecnie znanych roślin (Ryan i wsp., 2008). Dotychczasowe badania wskazują na wręcz konieczną ich obecność (endofity obligatoryjne) oraz ważną rolę tych mikroorganizmów dla życia swoich gospodarzy (Compant i wsp., 2005, 2010; Santoyo i wsp., 2016). Wzajemne zależności i interakcje między bakteriami endofitycznymi i roślinami naturalnie występującymi na obszarach skażonych związkami ropopochodnymi nie zostały dokładnie opisane, a wiedza na ten temat jest fragmentaryczna. Zatem, celem przeprowadzonych badań było poznanie różnorodności zespołów bakterii endofitycznych związanych z roślinami spontanicznie kolonizującymi tereny przez wiele lat skażone związkami ropopochodnymi. W ramach przeprowadzonych badań zidentyfikowano bakterie frakcji hodowalnej i niehodowalnej, a także określono wybrane właściwości biochemiczne mikroorganizmów występujących w tkankach komonicy zwyczajnej (*L. corniculatus*), wiesiołka dwuletniego (*O. biennis*) i jastrzębca wysokiego (*H. piloselloides*).

Analiza wyników pirosekwencjonowania genu 16S rRNA uzyskanych w niniejszej pracy wykazała, że wśród zespołów bakterii endofitycznych badanych roślin (komonicy i jastrzębca), zdecydowanie przeważają przedstawiciele *Proteobacteria*. Typ ten stanowił 77,4% oraz 25,8% badanej populacji bakterii, odpowiednio u komonicy oraz jastrzębca. Natomiast, kolejnymi typami bakterii, mającymi znaczny udział w mikrobiomie badanych gatunków roślin są *Firmicutes* u komonicy (14,9%), a *Actinobacteria* u jastrzębca (23,6%). Wysoki udział endofitów zaliczanych do *Proteobacteria*, *Actinobacteria* i *Firmicutes* u różnych gatunków roślin (*Dactylis glomerata*, *Festuca rubra*, *Lolium perenne*, *Populus tremula* × *Populus alba*, *Arabidopsis thaliana*, *Hieracium aurantiacum*) potwierdzają wyniki innych badań metagenomicznych (Gottel i wsp., 2011; Bodenhausen i wsp., 2013; Aleklett i wsp., 2015; Beckers i wsp., 2017; Wemheuer i wsp., 2017). To, że u różnych gatunków roślin, najwyższy odsetek bakterii endofitycznych zaliczany jest do tych samych rang taksonomicznych może świadczyć o tym, że pewne szczepy bakterii posiadają tzw.

kompetencje endofityczne związane z kolonizacją gospodarza, pokonaniem bariery korzeni czy możliwością przeżycia w zajmowanych tkankach.

Badania dotyczące mikrobiomu roślin występujących na terenach skażonych związkami ropopochodnymi pokazują, że wraz ze wzrostem poziomu zanieczyszczenia dominacja poszczególnych rang taksonomicznych zmieniała się na korzyść *Proteobacteria*, szczególnie *Alpha*- i *Gammaproteobacteria* oraz *Actinobacteria*. W przeprowadzonych badaniach, w korzeniach jak i częściach nadziemnych komonicy oraz jastrzębca, zidentyfikowano OTU należące głównie do dwóch klas: *Alpha*- oraz *Gammaproteobacteria*. Może to wskazywać na istotną rolę tych endofitów w rozwoju roślin występujących na zanieczyszczonych obszarach. Tym bardziej, że bakterie endofityczne obu tych klas dominują wśród endofitów obecnych w momencie zawiązywania nasion u roślin *Crotalaria pumila* i *A. thaliana* (Truyens i wsp., 2015, 2016; Sanchez-Lopez i wsp., 2017).

Analiza frakcji hodowalnej endofitów zdolnych do rozkładu surowej ropy naftowej, izolowanych z komonicy, wiesiołka i jastrzębca również wskazała na dominację szczepów bakterii zaliczanych do *Gammaproteobacteria* oraz *Actinobacteria*. Z tkanek komonicy i wiesiołka wyizolowano endofity należące do *Alphaproteobacteria*, natomiast szczepy reprezentujące *Betaproteobacteria* odnaleziono u komonicy i jastrzębca. Jednak zdecydowana większość izolatów została zaklasyfikowana do *Gammaproteobacteria*, a wśród bakterii endofitycznych jastrzębca stanowiły one, aż 78% wszystkich wyizolowanych szczepów. Wyniki badań Peng i wsp. (2013) także wskazują na znaczny udział *Proteobacteria* wśród bakterii endofitycznych wyizolowanych z tkanek wyczyńca czerwonożółtego (*Alopecurus aequalis*) i szczawika rożkowatego (*Oxalis corniculata*), rosnących w glebie zanieczyszczonej substancjami ropopochodnymi, zwłaszcza WWA. Podobnie, wśród bakterii endofitycznych życicy trwałej, występującej na terenach zanieczyszczonych związkami ropopochodnymi, dominują izolaty należące do *Proteobacteria* oraz *Actinobacteria* (Kukla i wsp., 2014a,b). Przewaga tych samych jednostek taksonomicznych, zidentyfikowana poprzez pirosekwencjonowanie, jak i stosowanie metod hodowalnych, jasno wskazuje na istotną rolę tych bakterii endofitycznych. Może to oznaczać, że szczepy należące do wymienionych klas i rodzajów tworzą tzw. rdzeń zespołu bakterii endofitycznych, szczególnie tych roślin, które rosną na terenach zanieczyszczonych związkami ropopochodnymi.

Wielowymiarowe analizy statystyczne wskazują na istotność poziomu zanieczyszczenia, jako jednego z czynników wpływających na strukturę zespołów bakterii endofitycznych roślin rosnących w skażonych glebach (Tardif i wsp., 2016; Blain i wsp.,

2017). Peng i wsp. (2013) wykazali, że wraz ze wzrostem stężenia związków ropopochodnych statystycznie istotnie spadała ogólna liczebność bakterii endofitycznych. Wykazano również, że obecność węglowodorów w bezpośrednim otoczeniu roślin, wpływa na zwiększenie liczebności endofitów zdolnych do rozkładu tych związków oraz posiadających potencjalne mechanizmy promujące wzrost roślin (Siciliano i wsp., 2001; Tardif i wsp., 2016). W tkankach spartyny (*Spartina alterniflora*), występującej na obszarach zanieczyszczonych WWA, wykryto obecność bakterii degradujących węglowodory, należących do rodzajów *Pseudomonas*, *Penibacillus* i *Flavobacterium* (Su i wsp., 2016). Natomiast, wśród zespołów bakterii endofitycznych wierzby, rosnącej w glebie skażonej związkami ropopochodnymi, zanotowano wzrost udziału OTU, zaklasyfikowanych do rodzajów: *Pseudomonas*, *Steroidobacter*, *Sinorhizobium*, *Sphingobium* i *Rhizobium* (Tardif i wsp., 2016). Z kolei, w niniejszej pracy, w mikrobiomie komonicy i jastrzębca, najwięcej zidentyfikowanych OTU przyporządkowano do rodzajów: *Mesorhizobium*, *Pseudomonas*, *Bacillus* *Streptomyces*, *Delftia* i *Microbacterium*. Co ważne, przedstawiciele *Mesorhizobium* sp., *Pseudomonas* sp., *Morganella* sp. i *Stenotrophomonas* sp. odnaleziono zarówno w korzeniach jak i częściach nadziemnych komonicy i jastrzębca. Z jednej strony, może to wskazywać na systemiczną kolonizację rośliny przez endofity, które dostają się do rośliny głównie z ryzosfery, kolonizują początkowo korzenie, a później kolejne organy roślinne. Podobne wyniki uzyskali Wagner i wsp. (2016), którzy wykazali, że większość zidentyfikowanych OTU w liściach pokrywa się z OTU występującymi w korzeniach. Z drugiej strony, wiele bakterii wyżej wymienionych rodzajów, to ważne mikroorganizmy degradujące różne zanieczyszczenia, w tym węglowodory, wywierające korzystny wpływ na wzrost i rozwój roślin, szczególnie ważny w środowisku zdegradowanym (Porteous-Moore i wsp., 2006; Kukla i wsp., 2014; Zampolli i wsp., 2014; Pawlik i Piotrowska-Seget, 2015). Na przykład bakterie z rodzaju *Streptomyces* wytwarzają siderofory, umożliwiając pobieranie żelaza roślinom, a także produkują związki ograniczające wzrost fitopatogenów (Verma i wsp., 2011). Na uwagę zasługują także bakterie z rodzaju *Bacillus*. Szczepy te oprócz hamowania wzrostu *Fusarium* sp., solubilizacji fosforanów, często posiadają zdolność do wytwarzania biosurfaktantów i degradowania ropy naftowej (Khan i wsp., 2013; Souza i wsp., 2015). Przykładowo, dzięki introdukcji *B. subtilis* A1 do zanieczyszczonej gleby, stężenie węglowodorów zawierających od dziesięciu do dwudziestu dziewięciu atomów węgla w cząsteczce (C10-C29), w ciągu 7 dni obniżyło się o 87% (Parthipan i wsp., 2017). Z kolei, bakterie *Mesorhizobium* sp. posiadają liczne mechanizmy promujące wzrost roślin takie jak: wiązanie azotu atmosferycznego czy synteza deaminazy ACC (Laranjo i wsp., 2014).

Przedstawiciele rodzaju *Pseudomonas* są bardzo często izolowane z organów różnych roślin. Zostały one wyizolowane między innymi z tkanek życicy trwałej, wyczyńca czerwonożółtego, szczawika rożkowatego, topoli oraz bluszczu (Porteous-Moore i wsp., 2006; Peng i wsp., 2013; Kukła i wsp., 2014b; Tran i wsp., 2015). Występowanie bakterii z rodzaju *Pseudomonas* wśród endofitów, niewątpliwie związane jest ze specyficznymi i unikalnymi cechami tych mikroorganizmów. Przykładowo, szczepy *Pseudomonas* sp. zasiedlające tkanki bluszczu (*Toxicodendron radicans*), degradowały toksyczny dla bakterii i wierząt olejek „urushiol” wytwarzany przez tę roślinę. Zdolność ta pozwala więc bakteriom na kolonizację tkanek tej trującej rośliny (Tran i wsp., 2015). Obok zdolności do promowania wzrostu roślin, wiele bakterii z rodzaju *Pseudomonas* posiada enzymy zaangażowane w rozkład alifatycznych i aromatycznych węglowodorów (Weyens i wsp., 2009c,d; Khan i wsp., 2013; Pawlik i wsp., 2015, 2017). Z tego względu, szczepy te stosowane są jako bioszczepionki, które w fitoremediacji wspomaganej, zwiększają efektywność rozkładu zanieczyszczeń ropopochodnych (Preston, 2004; Compant i wsp., 2005; Khan i wsp., 2013; Sessitsch i wsp., 2013; Sun i wsp., 2014).

Peng i wsp. (2013) wykazali, że u różnych gatunków roślin, występujących na tym samym skażonym obszarze, dominowały odmienne grupy bakterii endofitycznych. Podobne zależności zaobserwowano w prezentowanych badaniach. Bakterie zdolne do rozkładu surowej ropy naftowej z rodzaju *Pseudomonas* dominowały wewnątrz tkanek komonicy i jastrzębca, podczas gdy przedstawiciele rodzaju *Rhizobium*, stanowiły większość hodowalnych endofitów wiesiołka. Z kolei, *Delftia* sp., *Serratia* sp. i *Tsukamurella* sp. zostały wyizolowane tylko z tkanek komonicy, *Xanthomonas* sp. tylko z tkanek wiesiołka, a *Burkholderia* sp., *Enterobacter* sp., *Microbacterium* sp., *Pantoea* sp. tylko z tkanek jastrzębca. Wyniki sekwencjonowania również ujawniły dominację odmiennych grup endofitów. Bakterie z rodzaju *Buchnera*, odnaleziono jedynie w łodygach komonicy. Natomiast dla mikrobiomu korzenia jastrzębca wysokiego charakterystyczne były bakterie z rodzaju *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Rhodanobacter* i *Asteroleplasma*. Badania Phillips i wsp. (2008) wykazały obecność specyficznych gatunków bakterii endofitycznych dla lucerny siewnej (*Medicago sativa*), życicy trwałej (*Lolium perenne*), *Elymus angustus* i perzu (*Agropyron* sp.) zebranych z tego samego terenu skażonego węglowodorami. Podobnie, mikrobiomy krwawnika pospolitego (*Achillea millefolium*), nawłoci kanadyjskiej (*Solidago canadensis*), koniczyny złocistożółtej (*Trifolium aureum*) i kupkówki pospolitej (*Dactylis glomerata*) charakteryzowały się specyficznym gatunkowo składem zespołów bakterii endofitycznych (Lumactud i wsp., 2016). Wyniki te potwierdzają obserwacje innych autorów,

którzy uważają, że kluczowym czynnikiem decydującym o składzie mikrobiomu jest gatunek rośliny (Phillips i wsp., 2008; Aleklett i wsp., 2015; Lumactud i wsp., 2016) oraz stadium jej rozwoju (van Overbeek i van Elsas, 2008; Shi i wsp., 2014). Nadrzędną rolę roślin w kształtowaniu swoistego mikrobiomu pokazują wyniki Gottel i wsp. (2011). Przedstawili oni analizę wyników pirosekwencjonowania, która wykazała dominację odmiennych typów bakterii i różny udział poszczególnych jednostek taksonomicznych w ryzosferze i endosferze topoli. Natomiast, w tkankach wierzby zidentyfikowano OTU występujące również w ryzosferze, jednakże analizy metagonomiczne pozwoliły na wskazanie OTU, charakterystycznych i unikalnych tylko dla tej rośliny (Tardif i wsp., 2016). Ponadto, zaobserwowano, że w ryzosferze liczba OTU była 10-krotnie wyższa niż w tkankach rośliny (Gottel i wsp., 2011; Wang i wsp., 2016b). Podobnie, Beckers i wsp. (2017) zwrócili uwagę na bardzo duży spadek różnorodności gatunkowej bakterii obecnych w tkankach topoli, w porównaniu do mikrobiomu ryzosfery. Mając to na uwadze, znaczące obniżenie liczby zidentyfikowanych gatunków bakterii w korzeniach roślin oraz wspólne OTU zidentyfikowane w tkankach roślin i ryzosferze, można przypuszczać, że rośliny mogą być swoistym rodzajem „filtra”, decydującym o tym, które bakterie będą kolonizować jej tkanki (Wang i wsp., 2016b).

W niniejszej pracy w mikrobiomie korzeni jastrzębca i łądyg komonicy zidentyfikowano typ bakterii opisany w literaturze jako *TM7*, którego udział był niewielki. Badania Beckers i wsp. (2017) pokazują jednak, że typ ten może być dominującą grupą w endosferze innych roślin np. topoli.

Na podstawie wyznaczonych indeksów Gooda, Chao1, Shannona i Simpsona możliwe było porównanie bioróżnorodności zespołów bakterii endofitycznych badanych roślin. Wysoka wartość indeksu Gooda pozwala przypuszczać, że uzyskane wyniki odnoszą się do znaczącej części populacji endofitów danego gospodarza i odzwierciedlają znaczną różnorodność gatunkową bakterii, obserwowaną w badanych próbach. Najbardziej skrajne wartości wszystkich wskaźników bioróżnorodności wyznaczono dla korzeni jastrzębca, gdzie były one najwyższe i korzeni komonicy, gdzie były najniższe. Niska bioróżnorodność (zgodna z indeksem  $H'$ ) i różnorodność gatunkowa (indeks Chao1 i Simpsona) wyznaczone dla korzeni komonicy niewątpliwie są związane z występowaniem jednego dominującego typu *Alphaproteobacteria*. Za dominację *Alphaproteobacteria* odpowiadają przedstawiciele *Mezorhizobium* stanowiący odpowiednio 98,3% oraz 43,2% wśród zespołów bakterii endofitycznych korzeni oraz łądygi komonicy. Natomiast, wysoka bioróżnorodność obserwowana dla korzeni jastrzębca jest wynikiem wysokiej różnorodności gatunkowej, co

potwierdza indeks Simpsona. Inni autorzy również zwracali uwagę na znaczną przewagę jednego lub kilku rodzajów bakterii determinujących dominację danego typu (Bodenhausen i wsp., 2013; Sanchez-Lopez i wsp., 2017). Przykładowo, wyniki sekwencjonowania mikrobiomu nasion *C. pumila* wskazują na dominację *Alphaproteobacteria*, jako rezultat wysokiego udziału *Methylobacterium* sp. w badanym zespole bakterii endofitycznych (Sanchez-Lopez i wsp., 2017). Na uwagę zasługuje również fakt, że w przypadku endofitów liści jastrzębca, ponad 80% OTU nie zostało przypisanych do żadnej jednostki taksonomicznej. Odzwierciedlają to wyznaczone metryki gdzie obserwowano niską bioróżnorodność i różnorodność gatunkową. Co więcej, w niniejszej pracy z liści jastrzębca wyizolowano jedynie szczepy należące do rodzaju *Tsukamurella*, zdolne do rozkładu surowej ropy naftowej. Mikrobiom jastrzębca wysokiego nie został jak dotąd opisany w literaturze. Jedyne doniesienia odnoszące się do roślin należących do *Oenothera* spp. są związane z ich wykorzystaniem w doświadczeniach fitoekstrakcji i fitostabilizacji miedzi (Gonzalez i wsp., 2011; Guo i wsp., 2014).

## **5.2. Wykorzystanie węglowodorów przez bakterie endofityczne i obecność genów kodujących enzymy zaangażowane w rozkład węglowodorów u badanych izolatów**

Wiele bakterii endofitycznych jest potencjalnie zdolnych do usuwania zanieczyszczeń organicznych, gdyż posiadają enzymy i szlaki metaboliczne niezbędne w tym procesie (Barac i wsp., 2004; Germaine i wsp., 2009). Przeprowadzone badania potwierdziły, że szczepy bakterii endofitycznych wykazują potencjał do rozkładu ropy naftowej, oleju napędowego i/lub *n*-heksadekanu. Ponad 90% izolatów komonicy i wiesiołka, a 77,8% endofitów jastrzębca było zdolnych do wykorzystania oleju diesla jako jedyne źródła węgla i energii. Najwięcej szczepów zdolnych do wykorzystania *n*-heksadekanu wyizolowano z tkanek jastrzębca, stanowiły one 44,4% wszystkich izolatów, zdolnych do rozkładu surowej ropy naftowej. Udział bakterii endofitycznych w rozkładzie węglowodorów alifatycznych i/lub aromatycznych takich jak: BTEX, fenantren, fluoren, naftalen, trinitrotoluen i WWA został potwierdzony także przez innych autorów (Phillips i wsp., 2008; Taghavi i wsp., 2009; Yousaf i wsp., 2010a, 2010b; Andreolli i wsp., 2013; Oliveira i wsp., 2014; Thijs i wsp., 2014).

Wyniki wykonanych w niniejszej pracy PCR pokazały, że znaczący odsetek szczepów bakterii endofitycznych rozkładających surową ropę naftową posiada geny

związane z degradacją węglowodorów alifatycznych i aromatycznych. Wśród izolatów jastrzębca, aż 88,9% posiadało gen *pah*, a 61,1% gen *C23O*, które kodują odpowiednio podjednostkę alfa dioksygenaz hydroksylujących wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne oraz dioksygenazę-2,3-katecholu. Dioksygenazy te, to jedne z enzymów szlaków rozkładu węglowodorów aromatycznych. Uważa się, że obecność u bakterii endofitycznych genów kodujących enzymy biorące udział w rozkładzie różnych związków ropopochodnych, wynika z ich ewolucyjnego przystosowania do wykorzystania roślinnych metabolitów jako źródła węgla. Metabolity roślinne często swoją budową i strukturą przypominają węglowodory, przez co potencjał degradacyjny endofitów wykazywany w stosunku do związków ropopochodnych łączy się z ich zdolnościami do kolonizowania i życia w tkankach roślinnych (van Beilen i wsp., 2006; van Bogaert i wsp., 2011).

Spośród badanych szczepów w niniejszej pracy ok. 40% izolatów posiadało gen *P450*, kodujący grupę enzymów zaangażowanych w degradację *n*-alkanów, o krótkiej i średniej długości łańcucha oraz kwasów tłuszczowych (van Beilen i wsp., 2006). Zdolność bakterii do degradacji pobranych przez rośliny węglowodorów, wykazali Wang i wsp. (2010). Z drugiej strony, bakterie posiadające geny kodujące enzymy degradujące alkany zostały odnalezione w środowiskach niezanieczyszczonych węglowodorami, co sugeruje również inne funkcje genów *alkB* i/lub *P450* (rodzina CYP153) u tych bakterii (Brooijmans i wsp., 2009). Uważa się, że u endofitów pełnią one ważną rolę w pokonywaniu epidermy, pierwszej bariery w procesie kolonizacji tkanek roślinnych. Epiderma często pokryta jest woskami, w których składzie występują alkany o długich łańcuchach, w których degradację mogą być zaangażowane enzymy kodowane przez geny *alkB* i/lub *P450* (rodzina CYP153) (van Bogaert i wsp., 2011; Nie i wsp., 2014).

### 5.3. Charakterystyka wyizolowanych bakterii endofitycznych

Szczególne znaczenie dla roślin zasiedlających zanieczyszczone tereny mają endofity promujące wzrost roślin (PGPE). Jest to grupa bakterii, która poprzez szereg pośrednich i bezpośrednich mechanizmów wspomaga rozwój roślin narażonych na zanieczyszczenia. Synteza przez PGPE takich związków jak auksyna, enzymy np. deaminaza ACC, czy zdolność tych bakterii do solubilizacji fosforanów, produkcji biosurfaktantów i sideroforów, często skorelowana jest z ograniczeniem negatywnego wpływu toksycznych związków organicznych na rośliny (Glick i wsp., 2012; Khan i wsp., 2013).



Niektóre bakterie wytwarzają związki powierzchniowo czynne, zwane biosurfaktantami, które odpowiedzialne są za zwiększanie biodostępności hydrofobowych cząsteczek węglowodorów i możliwość ich dalszej biodegradacji (Pacwa-Płociniczak i wsp., 2011). W przeprowadzonych badaniach endofity syntetyzujące biosurfaktanty/bioemulsyfikatory wyizolowano z tkanek komonicy i wiesiołka. Należą one do rodzaju *Serratia*, *Delftia*, *Rhodococcus*, *Rhizobium* oraz *Pseudomonas*. Biosurfaktanty, ze względu na zróżnicowaną budowę chemiczną, mogą spełniać różne funkcje. Wykazano, że hamują wzrost patogenów, wspomagają kolonizację tkanek roślinnych, poprawiają ruchliwość komórek bakteryjnych i/lub ułatwiają dostęp enzymów zaangażowanych w rozkład ściany komórkowej do powierzchni tkanek rośliny (Andersen i wsp., 2003; Raaijmakers i wsp., 2006; Velho i wsp., 2011).

Kluczowymi czynnikami wpływającymi na sprawną kolonizację tkanek roślinnych i dalsze rozprzestrzenianie się mikroorganizmów endofitycznych wewnątrz roślin są: wydzielanie enzymów celulolitycznych i zdolność do ruchu. Wiele szczepów w prezentowanej pracy wytwarzało enzymy celulolityczne. Stanowiły one odpowiednio wśród bakterii endofitycznych komonicy i wiesiołka 41,7% i 64,3% wszystkich izolatów. Cecha ta wydaje się mieć decydujące znaczenie w zawiązywaniu ścisłych interakcji między roślinami a bakteriami (Verma i wsp., 2001; Pereira i wsp., 2016). Potwierdzają to badania Germaine i wsp. (2009), którzy wykazali, że tylko szczepy zdolne do jednoczesnego ruchu, zasiedlania korzeni i rozkładu naftalenu chroniły rośliny przed toksycznym wpływem węglowodorów. Z kolei, bakterie *Burkholderia fungorum* DBT1, które efektywnie kolonizowały korzenie i rozkładały węglowodory, zwiększały efektywność fitoremediacji (Andreolli i wsp., 2013).

Za najważniejszy mechanizm promujący wzrost roślin uważa się zdolność bakterii endofitycznych do produkcji IAA (Weyens i wsp., 2009c,d; Glick i wsp., 2012). Wszystkie wyizolowane szczepy bakterii endofitycznych zdolne do rozkładu surowej ropy naftowej, syntetyzowały kwas indoilo-3-octowy i uwalniały IAA do pożywki w różnej koncentracji. Wysoki odsetek bakterii produkujących IAA wyizolowano także z innych roślin narażonych na zanieczyszczenia (Etesami i wsp., 2014; Kukla i wsp., 2014; Pawlik i Piotrowska-Seget, 2015; Pereira i wsp., 2016; Xu i wsp., 2016). Szczepy syntetyzujące IAA stymulują wzrost komórek korzeni i ich wydłużanie, co jest istotne podczas kiełkowania i rozwoju wielu roślin (Garbeva i wsp., 2001; Seghers i wsp., 2004; Ikeda i wsp., 2010). Przykładowo, sadzonki *A. thaliana* inokulowane bakteriami endofitycznymi wytwarzającymi IAA, posiadały zdecydowanie więcej korzeni włóśnikowych, w porównaniu do nieinokulowanej kontroli

(Abbamondi i wsp., 2016). Ponadto, szczepy wytwarzające IAA, wydają się efektywniej kolonizować korzenie roślin niż bakterie pozbawione zdolności do syntezy tego fitohormonu. Etesami i wsp. (2014) wykazali silną korelację pomiędzy produkcją IAA przez bakterie i ich zdolnością do kolonizacji rośliny. Bakterie uwalniają IAA w szerokim zakresie stężeń, przez co wywierają zróżnicowany efekt na rośliny (Zúñiga i wsp., 2013). Rośliny inokulowane zawiesiną szczepu *Pantoea* sp. FF34 produkującym IAA w stężeniu  $95,3 \pm 2,1 \mu\text{g IAA ml}^{-1}$  podłoża, osiągały mniejszą biomasę korzeni, w porównaniu do roślin podlewanych zawiesiną szczepów produkujących IAA w niskich stężeniach w zakresie od  $7,5 \pm 1,0$  do  $12,3 \pm 1,0 \mu\text{g IAA ml}^{-1}$  podłoża (Naveed i wsp., 2014). Ponieważ, aż 56,8% bakterii endofitycznych wyizolowanych z badanych gatunków roślin produkowało IAA w stężeniu niższym niż  $10 \mu\text{g IAA ml}^{-1}$  podłoża, wydaje się, że jest to stężenie wystarczające do wspomagania wzrostu roślin.

Szczepy wykazujące aktywność deaminazy ACC wzbudzają duże zainteresowanie ze względu na swoistą funkcję tego enzymu (Glick, 2014). Enzym ten rozkłada kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy, będący prekursorem etylenu. Rozkład tego kwasu powoduje zmniejszenie syntezy tego fitohormonu w roślinach i ogranicza jego hamujący wpływ na wzrost roślin (Glick i wsp., 2007; Hardoim i wsp., 2008). Szczepy wytwarzające deaminazę ACC odgrywają szczególnie istotną rolę w środowisku, w którym roślina narażona jest na stresy abiotyczne związane z występowaniem zanieczyszczeń. W przeprowadzonych badaniach prawie połowa izolatów komonicy i wiesiołka wykazywała potencjalną zdolność do syntezy deaminazy ACC. Wśród endofitów jastrzębca udział tych bakterii był jeszcze wyższy i wynosił aż 77,8% wszystkich izolatów zdolnych do rozkładu surowej ropy naftowej. Bakterie produkujące deaminazę ACC, stymulując wzrost i rozwój systemu korzeniowego, umożliwiają roślinom zwiększone pobieranie zanieczyszczeń i ich dalsze przekształcenie (Arshad i wsp., 2007; Glick i wsp., 2007; Qin i wsp., 2015). Zdolność do promowania wzrostu roślin oraz zwiększania wydajności fitoremediacji wykazywał syntetyzujący deaminazę ACC szczep *Pantoea* sp. BTRH79 (Arslan i wsp., 2014). Z kolei, u *Burkholderia phytofirmans* PsJN usunięcie fragmentu genu *acdS* skutkowało syntezą nieaktywnego enzymu i utratą zdolności do promowania wzrostu korzeni rzepaku (Sun i wsp., 2009).

#### 5.4. Wpływ bakterii endofitycznych na efektywność usuwania TPH z gleby oraz wzrost roślin w procesie fitoremediacji

Postępująca degradacja środowiska naturalnego związana z niekontrolowanym uwalnianiem związków ropopochodnych do gleby, których toksyczne i mutagenne właściwości wpływają negatywnie na organizmy żywe, zmusza do poszukiwania alternatywnych metod remediacji środowiska. Pomimo pewnych ograniczeń, obiecującą techniką oczyszczania środowiska naturalnego jest fitoremediacja wspomagana wyselekcjonowanymi szczepami bakterii (Vangronsveld i wsp., 2009). Szczególne miejsce w tym procesie zajmują bakterie endofityczne, które wchodzi w bardzo ścisłe interakcje ze swoim gospodarzem (Weyens i wsp., 2009a,b,c; Khan i wsp., 2013; Santoyo i wsp., 2016). Bardzo często, rozwój roślin i przyrost ich biomasy na terenach skażonych jest powolny, co stanowi poważne ograniczenie procesów fitoremediacji, dlatego niezwykle ważne jest wykorzystanie bakterii endofitycznych do promowania wzrostu roślin.

Wykorzystanie w fitoremediacji odpowiednich gatunków roślin, wykazujących naturalne przystosowania do wzrostu w skażonych glebach, znacznie przyspiesza proces usuwania związków ropopochodnych z gleby. W praktyce, najczęściej stosowane są rośliny posiadające dobrze rozwinięty, głęboko sięgający system korzeniowy oraz takie, które osiągają wysoki przyrost biomasy. Wyniki wielu badań pokazują, że w fitoremediacji środowisk zanieczyszczonych związkami organicznymi szczególnie przydatne są trawy z gatunku życia (*Lolium* sp.) (Kirk i wsp., 2005; Tang i wsp., 2010; Escaray i wsp., 2012). Wybrana do badań życica trwała okazała się rośliną oporną na wysokie stężenia związków ropopochodnych ( $12853,34 \pm 322,62$  mg TPH  $\text{kg}^{-1}$  s.m. gleby).

Bakterie endofityczne wykorzystane w przeprowadzonym doświadczeniu fitoremediacyjnym zostały wyizolowane z tkanek wiesiołka dwuletniego. Ze względu na zdolność tych bakterii do kolonizacji tkanek życicy, która nie jest macierzystym gospodarzem badanych endofitów, można wnioskować, że są to endofity fakultatywne. Co prawda, wiele bakterii endofitycznych ma zdolność do kolonizowania odmiennych gatunków roślin, jednak niektóre z nich mogą być patogenne dla roślin innych niż rodzicielskie (Hardoim i wsp., 2008). Z uwagi na fakt, iż wyselekcjonowane bakterie, 5WK oraz 10WK, nie wywierały szkodliwego wpływu na życicę, mogłyby być potencjalnie wykorzystywane w fitoremediacji wspomaganej.

Zastosowane w niniejszej pracy bakterie endofityczne istotnie wpływały na obniżenie stężenia TPH w badanej glebie. Pre-inokulacja nasion życicy i inokulacja gleby

wyselekcjonowanymi bakteriami w postaci konsorcjum (PI+5WK+10WK) prowadziła do najwyższego ubytku (19,1%) TPH ze skażonej gleby. Podobnie, badania Fatima i wsp. (2016) wykazały, że wykorzystanie roślin i konsorcjum bakterii endofitycznych prowadzi do znacznego obniżenia stężenia węglowodorów w glebie, nawet o 78%. Z kolei, Chuluun i wsp. (2014) obserwowali pozytywny wpływ wprowadzonego konsorcjum bakterii na wydajność fitoremediacji wspomaganej. Średni ubytek TPH w glebie inokulowanej konsorcjum bakteryjnym był o 7,3% wyższy, niż w fitoremediacji bez inokulacji bakteriami, a o 5,3% wyższy niż w glebie poddanej bioaugmentacji (Chuluun i wsp., 2014). Co więcej, inokulacja roślin bakteriami endofitycznymi powoduje także szybszy wzrost korzeni i przyrost biomasy roślin, co w konsekwencji prowadzi do efektywniejszego usuwania TPH z gleby (Wang i wsp., 2010). Wyniki badań Wang i wsp. (2010) oraz Afzal i wsp. (2013) wykazały, że wykorzystanie w fitoremediacji wspomaganej specyficznych szczepów endofitów degradujących węglowodory, zmniejszało fitotoksyczność tych związków.

Analiza statystyczna uzyskanych wyników wykazała, że metoda inokulacji bakterii endofitycznych (inokulacja gleby (SI) lub pre-inokulacja nasion z inokulacją gleby (PI)) miała istotny wpływ na obserwowany spadek stężenia TPH. Afzal i wsp. (2011) wykazali, że zastosowanie życicy wielokwiatowej (*Lolium multiflorum*) może przyczynić się do spadku stężenia węglowodorów w zakresie od 12% do 20%, w zależności od typu gleby. W przeprowadzonych badaniach, w nieinokulowanych glebach (S) i (R), ubytek TPH wynosił odpowiednio 1,7% i 4,7% stężenia wyjściowego. Tak niski spadek stężenia TPH w procesie bioremediacji podstawowej najprawdopodobniej wynika z bardzo wysokiego początkowego stężenia TPH w badanej glebie, które hamowało aktywność mikroorganizmów i rozwój roślin. Uważa się, że metody biologiczne są najbardziej skuteczne podczas oczyszczania środowisk, w których stężenie związków ropopochodnych mieści się w granicach 5-10% s.m. gleby. Natomiast, dla większości bakterii i grzybów mikroskopowych stężenie związków ropopochodnych mieszczące się w zakresie od 1 do 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  wody lub 1 do 100  $\mu\text{g g}^{-1}$  s.m. gleby jest nietoksyczne (Steliga, 2014). Ponadto, pierwsze zabiegi bioremediacyjne powinno się podejmować dopiero po obniżeniu wysokiej zawartości zanieczyszczeń ropopochodnych (70 000-200 000 mg TPH  $\text{kg}^{-1}$  s.m. gleby) o 50-75%, stosując wstępną remediację i metody fizykochemiczne (Steliga, 2014). Przyjmuje się, że skuteczność usuwania węglowodorów ropopochodnych z gleby w wyniku zastosowania metod biologicznych jest zgodna ze schematem, w którym wydajność maleje w kolejności: fitoremediacja z inokulacją szczepów > bioaugmentacja  $\approx$  fitoremediacja niewspomagana przez bakterie (Xu i wsp., 2014).

Inokulacja gleby szczepami 5WK, 10WK prowadziła do przyrostu biomasy życicy w czasie doświadczenia. Współczynnik wzrostu roślin był najwyższy podczas pre-inokulacji nasion z inokulacją gleby szczepem 5WK (PI+5WK+10WK) i wynosił 106,1%. Analiza statystyczna wykazała, że metoda inokulacji szczepów bakterii endofitycznych istotnie wpływała na uzyskaną biomasa życicy w czasie trwania doświadczenia fitoremediacyjnego. Co ważne, porównując biomasa życicy uzyskaną podczas zastosowania metody inokulacji gleby (SI), z biomasa życicy otrzymaną po pre-inokulacji nasion z inokulacją gleby (PI), okazało się, że w tym drugim przypadku odnotowano słaby przyrost biomasy życicy. Mogło to być związane z przeprowadzoną sterylizacją nasion, podczas której zastosowane środki chemiczne obniżyły siłę ich kiełkowania, zwłaszcza na początku eksperymentu (Sen i wsp., 2013; Barampuram i wsp., 2014).

### **5.5. Przeżywalność bakterii endofitycznych wprowadzanych do gleby i ich zdolność do kolonizacji tkanek roślinnych**

Warunkiem skutecznego działania szczepów w procesie fitoremediacji wspomaganej jest ich zdolność do przeżywania w zanieczyszczonej glebie, do której zostały wprowadzone (Germaine i wsp., 2009; Afzal i wsp., 2013). Jest to bowiem jeden z niezbędnych czynników, który determinuje wytworzenie interakcji między roślinami a bakteriami.

Ocena przeżywalności bakterii endofitycznych, oparta na hodowli rifamipicynoopornych szczepów 5WK i 10WK, wykazała, że różniły się one zdolnością do kolonizacji tkanek roślinnych życicy oraz przeżywalnością w glebie. Szczepy bakteryjne wykorzystane jako inokulum efektywniej kolonizowały tkanki roślinne niż glebę, co może być związane z tym, że są to bakterie endofityczne, których naturalnym środowiskiem życia jest wnętrze roślin. Yousaf i wsp. (2011) wykazali, że bakterie endofityczne, wykorzystane jako inokulum do wspomagania fitoremediacji, zdecydowanie efektywniej kolonizowały właśnie te części roślin, z których pierwotnie zostały wyizolowane. Generalnie, obserwuje się, że bakterie endofityczne są najlepszymi kolonizatorami powierzchni roślin. Wydaje się, że jest to powiązane z cyklem życiowym endofitycznych bakterii i ich specyficznymi cechami (Rosenblueth i Martinez-Romero, 2006; Andria i wsp., 2009; Yousaf i wsp., 2011; Pisarska i Pietr, 2014). Badania innych autorów wykazały, że kolonizacja tkanek roślin przez bakterie zależna jest także od warunków środowiska. W warunkach stresu środowiskowego (zanieczyszczenie, niska zawartość azotu, susza) proces ten zachodzi szybciej (Siciliano i wsp., 2001; Oliveira i wsp., 2003; Vargas i wsp., 2014).

W prezentowanych badaniach obserwowano, że metoda inokulacji bakterii, pre-inokulacja nasion z inokulacją gleby (PI), ma wpływ na zaobserwowane różnice w zdolności do przeżywania w glebie i tkankach roślinnych obu szczepów bakterii. Wydaje się, że pre-inokulacja pozwala na zapoczątkowanie korzystnych oddziaływań między bakteriami a roślinami, kolonizację powierzchni nasion, a następnie korzeni i części nadziemnych rośliny.

## **5.6. Wpływ introdukowanych szczepów bakterii endofitycznych na bakterie autochtoniczne gleby**

W skład zespołu mikroorganizmów autochtonicznych gleby wchodzi wiele gatunków, dlatego ich wpływ na przeżywalność inokulowanych bakterii może być bardzo istotny. Z drugiej strony, wprowadzone do gleby bakterie mogą zmieniać strukturę zespołów mikroorganizmów autochtonicznych gleby.

Analiza wyników real-time PCR wykazała, że największy wpływ na zmianę liczby kopii genów 16S rRNA i *alkH* miał czas i zastosowany szczep/konsorcjum bakterii. Wprowadzenie konsorcjum szczepów (SI+5WK+10WK; PI+5WK+10WK) istotnie wpływało na zmianę ogólnej liczebności bakterii autochtonicznych w badanej glebie. Natomiast nie miało ono wpływu na zmianę liczebności bakterii zdolnych do rozkładu węglowodorów alifatycznych. Występowanie istotnych różnic w obserwowanej liczbie kopii genu 16S rRNA podczas fitoremediacji prawdopodobnie jest związane z rozwojem roślin i zwiększoną produkcją wydzielin korzeniowych, dostarczających składników odżywczych bakteriom i stymulujących ich wzrost. Po zakończeniu procesu fitoremediacji, liczba kopii genu 16S rRNA i *alkH* była niska i porównywalna we wszystkich układach doświadczalnych. Obserwowana dynamika zmiany liczby kopii obu genów może być wynikiem interakcji bakterii z rośliną i reakcją wprowadzonych szczepów na rozwój rośliny. Nie i wsp. (2011) stwierdzili, że w czasie wzrostu wegetatywnego rośliny, liczba kopii genu *alkB* w glebie była wyższa, niż podczas kiełkowania i kwitnienia. Tym samym, potencjał degradacyjny zespołów mikroorganizmów glebowych był wyższy właśnie w tej fazie rozwoju rośliny. Wyniki innych badań sugerują, że wysoka liczba kopii genów związanych z rozkładem związków ropopochodnych w ryzosferze, jest wynikiem dostarczanych przez korzenie, wraz z wydzielinami, wielu związków, w tym kometabolitów. Ponadto, dostępność dodatkowych składników odżywczych może promować wzrost i podział bakterii oraz mineralizację węglowodorów przez mikroorganizmy (Andria i wsp., 2009; Arslan i wsp., 2014).

## VI. Wnioski

1. W tkankach komonicy zwyczajnej, wiesiołka dwuletniego oraz jastrzębca wysokiego występowały szczepy bakterii endofitycznych promujących wzrost roślin (PGPE). Wyizolowane bakterie endofityczne posiadały geny kodujące enzymy zaangażowane w degradację węglowodorów alifatycznych i/lub aromatycznych oraz szereg mechanizmów odpowiedzialnych za wspomaganie wzrostu roślin.
2. Wyizolowane bakterie endofityczne zdolne do rozkładu surowej ropy naftowej należały głównie do *Gammaproteobacteria*, wśród których dominował rodzaj *Pseudomonas*.
3. Analiza metagenomiczna wykazała, że przedstawiciele *Proteobacteria*, *Actinobacteria* i *Firmicutes* dominowały w mikrobiomie komonicy zwyczajnej i jastrzębca wysokiego. Najwyższą bioróżnorodność bakterii obserwowano wewnątrz korzeni jastrzębca, a najniższą wewnątrz korzeni komonicy.
4. Zastosowana metoda inokulacji bakterii endofitycznych, podczas doświadczenia fitoremediacyjnego, istotnie wpływała na obniżenie stężenia oleju mineralnego w glebie. Największą efektywność fitoremediacji wspomaganej uzyskano przy pre-inokulacji nasion z inokulacją gleby konsorcjum szczepów *Rhodococcus erythropolis* 5WK i *Rhizobium* sp. 10WK (PI+5WK+10WK).
5. Wprowadzone do gleby szczepy *Rhodococcus erythropolis* 5WK oraz *Rhizobium* sp. 10WK nie powodowały trwałych zmian w strukturze zespołów mikroorganizmów autochtonicznych gleby.

## VII. Streszczenie

Bakterie endofityczne to grupa mikroorganizmów, na którą w ostatnich latach zwraca się szczególną uwagę. Udokumentowano, że bakterie endofityczne z powodzeniem mogą być wykorzystane do zwiększenia efektywności fitoremediacji gleb skażonych związkami ropopochodnymi. Największym zainteresowaniem cieszą się endofity zdolne jednocześnie do promowania wzrostu roślin i rozkładu toksycznych związków organicznych.

Celem badań była charakterystyka hodowalnej frakcji bakterii endofitycznych występujących w tkankach komonicy zwyczajnej (*Lotus corniculatus*), wiesiołka dwuletniego (*Oenothera biennis*) i jastrzębca wysokiego (*Hieracium piloselloides*) zdolnych do rozkładu surowej ropy naftowej. Bioróżnorodność mikrobiomu komonicy i jastrzębca oznaczona została poprzez pirosekwencjonowanie 454. Rośliny wykorzystane w badaniach zebrano z terenu rafinerii w Czechowicach-Dziedzicach, silnie zanieczyszczonego związkami ropopochodnymi. Wyizolowane szczepy bakterii charakteryzowano pod kątem ich potencjału do promowania wzrostu roślin i degradacji węglowodorów. Wybrane szczepy endofitów wchodziły w skład inokulum wykorzystanego podczas fitoremediacji.

Przeprowadzona izolacja bakterii endofitycznych pozwoliła na wyselekcjonowanie 44 szczepów zdolnych do wykorzystania surowej ropy naftowej, oleju diesla i/lub *n*-heksadekanu. Endofity te, oprócz genów kodujących enzymy, zaangażowane w rozkład węglowodorów, posiadały liczne mechanizmy wspomagające wzrost roślin, co pozwoliło je zaliczyć do grupy bakterii endofitycznych promujących wzrost roślin (PGPE). Wszystkie izolaty syntetyzowały kwas indolilo-3-octowy (IAA), a większość z nich posiadało zdolność do produkcji enzymów celulolitycznych (>40%) i ruchu (>80%). Na podstawie sekwencji fragmentu genu 16S rRNA określono przynależność gatunkową wyizolowanych endofitów, które zaklasyfikowano głównie do *Gammaproteobacteria*. Bakterie z rodzaju *Rhizobium* i *Rhodococcus* najliczniej występowały w tkankach wiesiołka, natomiast u komonicy i jastrzębca dominowały bakterie z rodzaju *Pseudomonas*.

Analiza metagenomiczna wykazała najwyższy udział przedstawicieli *Proteobacteria*, *Actinobacteria* i *Firmicutes* u komonicy zwyczajnej oraz jastrzębca wysokiego. Najwyższą bioróżnorodność i różnorodność zespołów bakterii endofitycznych obserwowano w korzeniach jastrzębca, natomiast najniższą w korzeniach komonicy, co niewątpliwie było wynikiem wyraźnej dominacji w badanej populacji bakterii przedstawicieli *Alphaproteobacteria*.



W fitoremediacji wspomaganej w okolicy nasion życicy trwałej (*Lolium perenne*) wprowadzano inokulum bakteryjne składające się z pojedynczych szczepów *Rhodococcus* sp. 5WK lub *Rhizobium* sp. 10WK lub konsorcjum obu z nich. Zastosowano dwie metody introdukcji przygotowanego inokulum: (1) inokulację gleby (SI) oraz (2) pre-inokulację nasion z inokulacją gleby (PI). Po 75 dniach fitoremediacji najwyższy spadek zawartości TPH zaobserwowano w glebie, gdzie zastosowano konsorcjum szczepów i metodę pre-inokulacji nasion z inokulacją gleby (PI+5WK+10WK). Ubytek TPH wynosił 19,1% początkowej zawartości oleju mineralnego w badanej glebie. Wielowymiarowa analiza statystyczna wykazała, że metoda wprowadzania szczepów do gleby istotnie wpływała nie tylko na obserwowany spadek stężenia TPH, ale także na przyrost biomasy roślin w czasie eksperymentu. Oba szczepy były zdolne do kolonizowania gleby i tkanek roślin, zarówno korzeni, jak i części nadziemnych, a ich introdukcja do gleby powodowała jedynie krótkotrwale zmiany w ogólnej liczebności i liczebności zdolnych do rozkładu węglowodorów alifatycznych zespołów bakterii autochtonicznych gleby.

Przedstawione wyniki mają duże znaczenie poznawcze, naukowe i potencjalnie praktyczne. Scharakteryzowane bakterie endofityczne mogą być przydatne w dalszych badaniach o charakterze zarówno podstawowym, jak i praktycznym, nad bioremediacją i fitoremediacją gleb skażonych związkami ropopochodnymi. Ponadto, otrzymane wyniki pozwoliły na uzupełnienie wiedzy na temat bioróżnorodności mikrobiomu roślin zasiedlających gleby silnie zanieczyszczone związkami ropopochodnymi. Istotnym wydaje się fakt poznania frakcji hodowalnej i niehodowalnej zespołów bakterii endofitycznych roślin naturalnie występujących na obszarach skażonych, ze szczególnym uwzględnieniem endofitów zdolnych do rozkładu związków ropopochodnych.

## VIII. Summary

Recent attention has been paid to the endophytic bacteria which live inside plant tissues without causing any apparent symptoms of diseases. These bacteria display a broad range of symbiotic interactions with their host. Several studies demonstrated that endophytes may significantly increase effectiveness of phytoremediation of soils polluted by petroleum hydrocarbons. The highest potential have hydrocarbon-degrading endophytic bacteria with multiple plant growth-promoting mechanisms and ability to survive in contaminated soil and to colonize plant tissues.

The aims of this study were to isolate and characterise crude oil-degrading endophytic bacteria from different tissues of the birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*), evening primrose (*Oenothera biennis*) and tall hawkweed (*Hieracium piloselloides*). These plants were collected in the highly-polluted area around the refinery in Czechowice-Dziedzice. The diversity and richness of microbiome of birdsfoot trefoil and tall hawkweed were assessed by 454 pyrosequencing. Furthermore, the biochemical traits considered as plant growth-promoting mechanisms of endophytes and their ability to grow on media containing crude oil, diesel oil, n-hexadecane, as sole carbon sources were evaluated. The selected strains were used as inoculum in the phytoremediation experiment.

Based on morphological characteristics, in total 44 crude oil-degrading endophytic bacteria were isolated from the interior tissues of three plants. The isolates possessed numerous mechanisms supporting plant growth, which allowed them to be included in the group of plant growth promoting endophytes (PGPE). All selected endophytes synthesized indole-3-acetic acid (IAA) at varying levels, and most of them had the ability to produce cellulolytic enzymes (> 40%). More than 80% of endophytes were found to be motile. PCR analyses revealed that catabolic genes that are associated with hydrocarbon degradation pathways were widespread in the tested strains. The isolates were identified based on sequencing of their 16S rDNA genes. *Gammaproteobacteria* comprised the majority of the isolated strains and were the predominant group in the investigated plant species. Bacterial isolates belonging to the genus *Rhizobium* and *Rhodococcus* were the most abundant in the tissues of *O. biennis*. *Pseudomonas* sp. was the most often isolated from *L. corniculatus* and *H. piloselloides*.

The metagenomics analysis showed that *Proteobacteria*, *Actinobacteria* and *Firmicutes* were the most abundant phyla in all samples. The highest bacterial diversity was

revealed in roots of *H. piloselloides*, while the lowest diversity was observed in roots of *L. corniculatus*. The predominance of *Alphaproteobacteria* was driven by the high abundance of mentioned phyla.

The impact of endophytic bacteria *Rhodococcus erythropolis* 5WK and *Rhizobium* sp. 10WK on petroleum hydrocarbons removal efficiency during phytoremediation with *Lolium perenne* was evaluated. In the phytoremediation experiment, two inoculation techniques: (1) soil inoculation (SI); (2) seeds pre-inoculation followed by soil inoculation (PI), were used. After 75 days of phytoremediation, the highest TPH removal (19.1%) was observed in the soil, where a consortium of strains and seed pre-inoculation method with soil inoculation (PI+5WK+10WK) were used. Multivariate statistical analysis showed that the method of strains inoculation significantly affected TPH removal and biomass production. Both strains were able to colonize the soil and interior plant tissues (roots and shoots), and their introduction into the soil caused only short-term changes in the total number and abundance of aliphatic hydrocarbon-degrading autochthonous microbial community in soil.

Presented results have a high cognitive, scientific and potentially practical significance. Characterised endophytic bacteria may be useful in further research of both a basic and practical nature, on bioremediation and phytoremediation of soils contaminated with petroleum hydrocarbons. In addition, results obtained in this project allowed to complement the knowledge about the abundance and biodiversity of the endophytic bacteria associated with plants growing spontaneously on heavily polluted environments.

## IX. Literatura

1. Abbamondi G.R., Tommonaro G., Weyens N., Thijs S., Sillen W., Gkorezis P., Iodice C., Rangel W.M., Nicolaus B., Vangronsveld J. 2016. Plant growth-promoting effects of rhizospheric and endophytic bacteria associated with different tomato cultivars and new tomato hybrids. *Chem. Biol. Technol. Agric.* 3.
2. Afzal M., Khan Q.M., Sessitsch A. 2014. Endophytic bacteria: prospects and applications for the phytoremediation of organic pollutants. *Chemosphere* 117, 232–242.
3. Afzal M., Khan S., Iqbal S., Mirza M.S., Khan Q.M. 2013. Inoculation method affects colonization and activity of *Burkholderia phytofirmans* PsJN during phytoremediation of diesel-contaminated soil. *Int. Biodeter. Biodegr.* 85, 331–336.
4. Afzal M., Yousafa S., Reichenauer T.G., Kuffner M., Sessitsch A. 2011. Soil type affects plant colonization, activity and catabolic gene expression of inoculated bacterial strains during phytoremediation of diesel. *J. Hazard. Mater.* 186, 1568–1575.
5. Aleklett K., Leff J.W., Fierer N., Hart M. 2015. Wild plant species growing closely connected in a subalpine meadow host distinct root-associated bacterial communities. *PeerJ* 3, e804, doi 10.7717/peerj.804.
6. Ali S., Duan J., Charles T.C., Glick B.R. 2014. A bioinformatics approach to the determination of genes involved in endophytic behavior in *Burkholderia* spp. *J. Theor. Biol.* 21, 193–198.
7. Alqueres S., Meneses C., Rouws L., Rothballer M., Baldani I., Schmid M., Hartmann A. 2013. The bacterial superoxide dismutase and glutathione reductase are crucial for endophytic colonization of rice roots by *Gluconacetobacter diazotrophicus* PAL5. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 23, 937–945.
8. Andersen J.B., Koch B., Nielsen T.H., Sørensen D., Hansen M., Nybroe O., Christophersen C., Sørensen J., Molin S., Givskov M. 2003. Surface motility in *Pseudomonas* sp. DSS73 is required for efficient biological containment of the root-pathogenic microfungi *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Microbiology* 149, 37–46.
9. Andreolli M., Lampis S., Poli M., Gullner G., Biró B., Vallini G. 2013. Endophytic *Burkholderia fungorum* DBT1 can improve phytoremediation efficiency of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Chemosphere* 92, 688–694.

10. Andria V., Reichenauer T.G., Sessitsch A. 2009. Expression of alkane monooxygenase (*alkB*) genes by plant-associated bacteria in the rhizosphere and endosphere of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) grown in diesel contaminated soil. *Environ. Pollut.* 157, 3347-3350.
11. Ardanov P., Ovcharenko L., Zaets I., Kozyrovska N., Pirttila A.M. 2011. Endophytic bacteria enhancing growth and disease resistance of potato (*Solanum tuberosum* L.). *Biol. Control.* 56, 43-49.
12. Arshad M., Saleem M., Hussain S. 2007. Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. *Trends Biotechnol.* 25, 356-362.
13. Arslan M., Afzal M., Amin I., Iqbal S., Khan Q.M. 2014. Nutrients can enhance the abundance and expression of alkane hydroxylase CYP153 gene in the rhizosphere of ryegrass planted in hydrocarbon-polluted soil. *PLoS ONE* 9, e111208.
14. Bacilio-Jiménez M., Aguilar-Flores S., Ventura-Zapata E., Pérez-Campos E., Bouquelet S., Zenteno E. 2003. Chemical characterization of root exudates from rice (*Oryza sativa*) and their effects on the chemotactic response of endophytic bacteria. *Plant Soil* 249, 271-277.
15. Bais H.P., Weir T.L., Perry L.G., Gilroy S., Vivanco J.M. 2006. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Ann. Rev. Plant Biol.* 57, 233-266.
16. Bais H.P., Fall R., Vivanco J.M. 2004. Biocontrol of *Bacillus subtilis* against infection of *Arabidopsis* roots by *Pseudomonas syringae* is facilitated by biofilm formation and surfactin production. *Plant Physiol.* 134, 307-319.
17. Balachandar D., Sandhiya G.S., Sugitha T.C.K., Kumar K. 2006. Flavonoids and growth hormones influence endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a diazotrophic *Serratia* sp. in rice. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 707-712.
18. Balasubramaniyam A. 2015. The influence of plants in the remediation of petroleum hydrocarbon contaminated sites. *Pharm. Anal. Chem.* 1, 1000105.
19. Baldani V.L.D., Baldani J.I., Dobereiner J. 2000. Inoculation of rice plants with the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum seropedicae* and *Burkholderia* spp. *Biol. Fert. Soils* 30, 485-491.
20. Barac T., Taghavi S., Borremans B., Provoost A., Oeyen A., Colpaert J.V., Vangronsveld J., van der Lelie D. 2004. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Natur. Biotechnol.* 22, 583-588.

21. Barampuram S., Allen G., Krasnyanski S. 2014. Effect of various sterilization procedures on the *in vitro* germination of cotton seeds. *Plant Cell, Tissue Organ. Cult.* 118, 179–185.
22. Becerra-Castro C., Kidd P.S., Prieto-Fernández Á., Weyens N., Acea M.J., Vangronsveld J. 2011. Endophytic and rhizoplane bacteria associated with *Cytisus striatus* growing on hexachlorocyclohexane-contaminated soil: isolation and characterization. *Plant Soil* 340, 413–433.
23. Beckers B., Beeck M.O., Weyens N., Boerjan W., Vangronsveld J. 2017. Structural variability and niche differentiation in the rhizosphere and endosphere bacterial microbiome of field-grown poplar trees. *Microbiome* 5, 25.
24. Belimov A.A., Dodd I.C., Hontzeas N., Theobald J.C., Safronova V.I., Daves W.J. 2009. Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase yield of plants grown in dry soil via both local systemic hormone signaling. *New Phytolog.* 181, 413–423.
25. Bernal P., Allsopp L.P., Filloux A., Llamas M.A. 2017. The *Pseudomonas putida* T6SS is a plant warden against phytopathogens. *ISME J.* 11, 972–987.
26. Blaha D., Prigent-Combaret C., Mirza M.S., Moenne-Loccoz Y. 2006. Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic *Proteobacteria* and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiol. Ecol.* 56, 455–470.
27. Blain N.P., Helgason B.L., Germida J.J. 2017. Endophytic root bacteria associated with the natural vegetation growing at the hydrocarbon-contaminated Bitumount Provincial Historic site. *Can. J. Microbiol.* 63, 502–515.
28. Bocheński C., Bocheńska A. 2008. Ocena zasobów ropy naftowej i perspektywy jej substitucji biopaliwami. *Motrol* 10, 23–30.
29. Boddey R.M., Oliveira O.C.D., Urquiaga S., Reis V.M., Olivares F.L.D., Baldani V.L.D., Döbereiner J. 1995. Biological nitrogen fixation associated with sugarcane and rice: contributions and prospects for improvement. *Plant Soil* 174, 195–209.
30. Bodenhausen N., Horton M.W., Bergelson J. 2013. Bacterial communities associated with the leaves and the roots of *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE* 8, e56329.
31. Böhm M., Hurek T., Reinhold-Hurek B. 2007. Twitching motility is essential for endophytic rice colonization by the N<sub>2</sub>-fixing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 20, 526–33.

32. Bordiec S., Paquis S., Lacroix H., Dhondt S., AitBarka E., Kauffmann S., Jeandet P., Mazeyrat-Gourbeyre F., Clement Ch., Baillieul F., Dorey S. 2011. Comparative analysis of defence responses induced by the endophytic plant growth-promoting rhizobacterium *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN and the non-host bacterium *Pseudomonas syringae* pv. pisi in grapevine cell suspensions. *J. Exp. Bot.* 62, 595–603.
33. Boyer M., Bally R., Perrotto S., Chaintreuil C., Wisniewski-Dyé F. 2008. A quorum-quenching approach to identify quorum-sensing-regulated functions in *Azospirillum lipoferum*. *Res. Microbiol.* 159, 699–708.
34. Brooijmans R.J., Pastink M.I., Siezen R.J. 2009. Hydrocarbon-degrading bacteria: the oil-spill clean-up crew. *Microb. Biotechnol.* 2, 6, 587-594.
35. Bulgarelli D., Rott M., Schlaepi K., Ver Loren van Themaat E., Ahmadinejad N., Assenza F., Rauf P., Huettel B., Reinhardt R., Schmelzer E., Peplies J., Gloeckner F.O., Amann R., Eickhorst T., Schulze-Lefert P. 2012. Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature* 2, 91-95.
36. Bulgarelli D., Schlaepi K., Spaepen S., Themaat E.L., Schulze-Lefert P. 2013. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 807–838.
37. Burdman S., Dulguerova G., Okon Y., Jurkevitch E. 2001. Purification of the major outer membrane protein of *Azospirillum brasilense*, its affinity to plant roots, and its involvement in cell aggregation. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14, 555-561.
38. Caporaso J.G., Kuczynski J., Stombaugh J., Bittinger K., Bushman F.D., Costello E.K., Fierer N., Gonzalez Peña A., Goodrich J.K., Gordon J.I., Huttley G.A., Kelley S.T., Knights D., Koenig J.E., Ley R.E., Lozupone C.A., McDonald D., Muegge B.D., Pirrung M., Reeder J., Sevinsky J.R., Turnbaugh P.J., Walters W.A., Widmann J., Yatsunenko T., Zaneveld J., Knight R. 2010a. QIIME allows analysis of highthroughput community sequencing data. *Nat. Methods* 7, 335–336.
39. Caporaso J.G., Bittinger K., Bushman F.D., DeSantis T.Z., Andersen G.L., Knight R. 2010b. PyNAST: a flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* 26, 266–267.
40. Castro R.A., Quecine M.C., Lacava P.T., Batista B.D., Luvizotto D.M., Marcon J., Ferreira A., Melo I.S., Azevedo J.L. 2014. Isolation and enzyme bioprospection of endophytic bacteria associated with plants of Brazilian mangrove ecosystem. *Springerplus* 28, 382.

41. Cebron A., Norini M.P., Beguiristain T., Leyval C. 2008. Real-time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD $\alpha$ ) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *J. Microbiol. Meth.* 73, 148-159.
42. Certik M., Dercova K., Sejakova Z., Findova M., Jakubik T. 2003. Effect of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) on the membrane lipids of bacterial cell. *Biologia Bratislava* 58, 1115-1121.
43. Chambers D.M., Reese C.M., Thornburg L.G., Sanchez E., Rafson J.P., Blount B.C., Ruhl J.R.E., De Jesus V.R. 2018. Distinguishing petroleum (crude oil and fuel) from smoke exposure within populations based on the relative blood levels of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX), styrene and 2,5-dimethylfuran by pattern recognition using artificial neural networks. *Environ. Sci. Technol.* 52, 308-316.
44. Chuluun B., Shah S.H., Rhee J.S. 2014. Bio-augmented phytoremediation: A strategy for reclamation of diesel oil-contaminated soils. *Int. J. Agric. Biol.* 16, 624-628.
45. Compant S., Clement C., Sessitach A. 2010. Plant growth-promoting bacteria in the rhizo- and endosphere of plants: Their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biol. Biochem.* 42, 669-678.
46. Compant S., Duffy B., Nowak J., Clement C., Barka E.A. 2005. Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: principles, mechanisms of action, and future prospects. *Appl. Environ. Microbiol.* 9, 4951-4959.
47. Compant S., Kaplan H., Sessitsch A., Nowak J., AitBarka E., Clement C. 2008. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN: from the rhizosphere to inflorescence tissues. *FEMS Microbiol. Ecol.* 63, 84-93.
48. De Meyer S.E., De Beuf K., Vekeman B., Willems A. 2015. A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biol. Biochem.* 83, 1-11.
49. Doty S.L. 2008. Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. *New Phytol.* 179, 318-333.
50. Dourado M.N., Bogas A.C., Pomini A.M., Andreote F.D., Quecine M.C., Marsaioli A.J., Araujo W.L. 2014. Methylobacterium-plant interaction genes regulated by plant exudates and quorum sensing molecules. *Braz. J. Microbiol.* 10, 1331-1339.
51. Dua M., Singh A., Sethunathan N., Johri A.K. 2002. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2-3, 143.



52. Dudai N., Tision I., Shamir S.Z., Nitzan N., Chaimovitsh D., Shachter A., Haim A. 2018. Agronomic and economic evaluation of Vetiver grass (*Vetiveria zizanioides* L.) as means for phytoremediation of diesel polluted soils in Israel. *J. Environ. Manage.* 2011, 247-255.
53. Dzantor E. 2007. Perspective Phytoremediation: the state of rhizosphere 'engineering' for accelerated rhizodegradation of xenobiotic contaminants. *J. Chem. Technol. Biot.* 82, 228-232.
54. Elbeltagy A., Nishioka K., Suzuki H., Sato T., Sato Y., Morisaki H., Mitsui H., Minamisawa K. 2000. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and traditionally cultivated rice varieties. *Soil Sci. Plant Nutr.* 46, 617–629.
55. Edgar R.C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* 26, 2460-2461.
56. Edgar R.C., Haas B.J., Clemente J.C., Quince C., Knight R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27, 2194–2200.
57. Edwards U., Rogall T., Blöcker H., Emde M., Böttger E.C. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes: characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucl. Acids Res.* 17, 7843–7853.
58. Elbeltagy A.K., Sato N.T., Suzuki H., Ye B., Hamada T., Isawa T., Mitsui H., Minamisawa K. 2001. Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a *Herbaspirillum* sp. isolated from wild rice species. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 5285–5293.
59. Eskandary S., Tahmourespour A., Hoodaji M., Abdollahi A. 2017. The synergistic use of plant and isolated bacteria to clean up polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soil. *J. Environ. Health Sci. Eng.* 15, doi 10.1186/s40201-017-0274-2.
60. Etesami H., Hosseini M., Alikhani H.A. 2014. In planta selection of plant growth promoting endophytic bacteria for rice (*Oryza sativa* L.). *J. Soil Sci. Plant Nutr.* 14, 2, 491-503.
61. Farag S., Soliman N.A., Abdel-Fattah Y.R. 2018. Statistical optimization of crude oil bio-degradation by a local marine bacterium isolate *Pseudomonas* sp. sp48. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* doi 10.1016/j.jgeb.2018.01.001.
62. Fatima K., Imran A., Amin I., Khan Q.M., Afzal M. 2016. Plant species affect colonization patterns and metabolic activity of associated endophytes during phytoremediation of crude oil-contaminated soil. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 6188–6196.

63. Fouts D.E., Tyler H.L., DeBoy R.T., Daugherty S., Ren Q., Badger J.H., Durkin A.S., Huot H., Shrivastava S., Kothari S., Dodson R.J., Mohamoud Y., Khouri H., Roesch L.F.W., Krogfelt K.A., Struve C., Triplett E.W., Methé B.A. 2008. Complete genome sequence of the N<sub>2</sub>-fixing broad host range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence predictions verified in mice. PLoS Genet. 4, e1000141 doi 10.1371/journal.pgen.1000141.
64. Franco S.S., Nardocci A.C., Günther W.M.R. 2008. PAH biomarkers for human health risk assessment: a review of the state-of-the-art Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, 24, 569–580.
65. Frick C.M., Farrell R.E., Germida J.J. 1999. Assessment of phytoremediation as an in-situ technique for cleaning oil-contaminated sites petroleum technology alliance of Canada (PTAC), Calgary.
66. Gaiero J.R., McCall C.A., Thompson K.A., Day N.J., Best A.S., Dunfield K.E. 2013. Inside the root microbiome: bacterial root endophytes and plant growth promotion. Am. J. Bot. 100, 1738-1750.
67. Gałązka A. 2015. Zanieczyszczenia gleb substancjami ropopochodnymi z uwzględnieniem biologicznych metod ich oczyszczenia. Kosmos 1, 145-164.
68. Gamalero E., Lingua G., Capri F.G., Fusconi A., Berta G., Lemanceau P. 2004. Colonization pattern of primary tomato roots by *Pseudomonas fluorescens* A6RI characterized by dilution plating, flow cytometry, fluorescence, confocal and scanning electron microscopy. FEMS Microbiol. Ecol. 48, 79e87.
69. Gamalero E., Lingua G., Tombolini R., Avidano L., Pivato B., Berta G. 2005. Colonization of tomato root seedling by *Pseudomonas fluorescens* 92rkG5: spatio-temporal dynamics localization, organization, viability and culturability. Microb. Ecol. 50, 289e297.
70. Gao M., Teplitski M. 2003. Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing. Mol. Plant Microbe Interact. 16, 827–834.
71. Garbeva P., Overbeek L.S., Vuurde J.W.L, Elsas J.D. 2001. Analysis of endophytic bacterial communities of potato by plating and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of 16S rDNA based PCR fragments. Microb. Ecol. 41, 369–383.
72. Germaine K.J., Keogh E., Ryan D., Dowling D.N. 2009. Bacterial endophyte-mediated naphthalene phytoprotection and phytoremediation. FEMS Microbiol. Lett. 296, 226–234.

73. Glick B.R. 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. Hindawi Publishing Corporation Scientifica ID 963401.
74. Glick B.R. 2014. Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.* 169, 30-39.
75. Glick B.R., Todorovic B., Czarny J., Cheng Z., Duan J., McConkey B. 2007. Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Crit. Rev. Plant Sci.* 26, 227–242.
76. Gocht T., Ligouis B., Hindere M., Grathwohl P. 2007. Accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons in rural soils based on mass balances at the catchment scale. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 591–600.
77. Gonzalez I., Cortes A., Neaman A., Rubio P. 2011. Biodegradable chelate enhances the phytoextraction of copper by *Oenothera picensis* grown in copper-contaminated acid soils. *Chemosphere* 84, 490–496.
78. Gordon A.S., Weber R.P. 1951. Colourimetric estimation of indole acetic acid. *Plant Physiol.* 26, 192–195.
79. Gottel N.R., Castro H.F., Kerley M., Yang Z., Pelletier D.A., Podar M., Karpinets T., Uberbacher E., Tuskan G.A., Vilgalys R., Doktycz M.J., Schadt C.W. 2011. Distinct microbial communities within the endosphere and rhizosphere of *Populus deltoides* roots across contrasting soil types. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5934–5944.
80. Graner G., Persson P., Meijer J., Alstrom S. 2003. A study on microbial diversity in different cultivars of *Brassica napus* in relation to its wilt pathogen, *Verticillium longisporum*. *FEMS Microbiol. Lett.* 29, 269–276.
81. Guo P., Wang T., Liu Y., Xia Y., Wang G., Shen Z., Chen Y. 2014. Phytostabilization potential of evening primrose (*Oenothera glazioviana*) for copper-contaminated sites. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 631–640.
82. Guzik U., Wojcieszńska D., Krysiak M., Kaczorek E. 2010. Mikrobiologiczny rozkład alkanów ropopochodnych. *Nafta-Gaz* 11, 1019-1027.
83. Hall J., Soole K., Bentham R. 2011. Hydrocarbon phytoremediation in the family Fabacea—a review. *Int. J. Phytorem.* 13, 317–332.
84. Hardoim P.R., Hardoim C.C.P., van Overbeek L.S., van Elsas J.D. 2012. Dynamics of seed-borne rice endophytes on early plant growth stages. *PLoS ONE* 7, e30438.
85. Hardoim P.R., Overbeek L.S., Berg G., Pirttilä A.M., Compant S., Campisano A., Döring M., Sessitsch A. 2015. The hidden world within plants: ecological and

- evolutionary considerations for defining functioning of microbial endophytes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 79, 3293-320
86. Hardoim P.R., van Overbeek L.S., van Elsas J.D. 2008. Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol.* 10, 463-471.
87. Ho Y.N., Mathew D.C., Hsiao S.C., Shih C.H., Chien M.F., Chiang H.M., Huang C.C. 2012. Selection and application of endophytic bacterium *Achromobacter xylosoxidans* strain F3B for improving phytoremediation of phenolic pollutants. *J. Hazard. Mater.* 219–220, 43–49.
88. <https://energy.usgs.gov/GeochemistryGeophysics/GeochemistryResearch/OrganicOriginsofPetroleum.aspx>
89. <https://maps.google.com>
90. Hung P.Q., Kumar S.M., Govindsamy V., Annapurna K. 2007. Isolation and characterization of endophytic bacteria from wild and cultivated soybean varieties. *Biol. Fertil. Soils* 44, 155–162.
91. Hurek T., Handley L.L., Reinhold-Hurek B., Piché Y. 2002. Azoarcus grass endophytes contribute fixed nitrogen to the plant in an unculturable state. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15, 233e242.
92. Ijaz A., Imran A., Anwar ul Haq M., Khan Q.M., Afzal M. 2016. Phytoremediation: recent advances in plant-endophytic synergistic interactions. *Plant Soil* 105, 179-195.
93. Ikeda S., Okubo T., Anda M., Nakashita H., Yasuda M., Sato S., Kaneko T., Tabata S., Eda S., Momiyama A., Terasawa K., Mitsui H., Minamisawa K. 2010. Community and genome-based views of plant-associated bacteria: plant–bacterial interactions in soybean and rice. *Plant Cell Physiol.* 51, 1398–1410.
94. Kaimi E., Mukaidani T., Miyoshi S., Tamaki M. 2006. Ryegrass enhancement of biodegradation in diesel-contaminated soil. *Environ. Exp. Bot.* 55, 110–119.
95. Kamath R., Rentz J.A., Schnoor J.L., Alvarez P.J.J. 2004. Petroleum biotechnology. Developments and perspectives studies in surface science and catalysis, Elsevier Science, Oxford.
96. Khan A.H.A., Ayaz M., Arshad M., Yousaf S., Khan M.A., Anees M., Sultan A., Nawaz I., Iqbal M. 2017. Biogeochemical cycle, occurrence and biological treatments of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Iran J. Sci. Technol. Trans. Sci.* doi 10.1007/s40995-017-0393-8.
97. Khan S., Afzal M., Iqbal S., Khan Q.M. 2013. Plant-bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils. *Chemosphere* 4, 1317–1332.

98. Kim S.J., Kweon O., Jones R.C., Freeman J.P., Edmondson R.D., Cerniglia C.E. 2007. Complete and integrated pyrene degradation pathway in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1 based on systems biology. *J. Bacteriol.* 189, 464–472.
99. Kirk J.L., Klironomos J.N., Lee H., Trevors J.T. 2005. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environ. Pollut.* 133, 455–465.
100. Kloepper J.W., Ryu C.M., Zhang S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94, 1259–1266.
101. Kołwzan B. 2008. Ocena przydatności inokulantów do bioremediacji gleby zanieczyszczonej produktami naftowymi. *Ochrona Środowiska* 30, 3-14.
102. Kołwzan B. 2011. Analiza zjawiska biofilmu–warunki jego powstawania i funkcjonowania. *Ochrona Środowiska* 33, 3-14.
103. Kubiak M.S. 2013. Wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne (WWA)–ich występowanie w środowisku i w żywności. *Probl. Hig. Epidemiol.* 94, 31-36.
104. Kukła M., Cania B., Płociniczak T., Piotrowska-Seget Z. 2014a. Fitoremediacja terenów skażonych związkami ropopochodnymi z wykorzystaniem bakterii endofitycznych. *Przemysł Chemiczny* 93, 355-359
105. Kukła M., Płociniczak T., Piotrowska-Seget Z. 2014b. Diversity of endophytic bacteria in *Lolium perenne* and their potential to degrade petroleum hydrocarbons and promote plant growth. *Chemosphere* 117, 40-46.
106. Kuklinsky-Sobral J., Araújo W.L., Mendes R., Geraldi I.O., Pizzirani-Kleiner A.A., Azevedo J.L. 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ. Microbiol.* 6, 1244–1251.
107. Lang F.S., Destain J., Delvigne F., Druart P., Ongena M., Thonart P. 2016. Characterization and evaluation of the potential of a diesel-degrading bacterial consortium isolated from fresh mangrove sediment. *Water Air Soil Pollut.* 227, doi 10.1007/s11270-016-2749-7.
108. Laranjo M., Alexandre A., Oliveira A. 2014. Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the *Mesorhizobium* genus. *Microbiol. Res.* 169, 2-17.
109. Lemanceau P., Corberand T., Gardan L., Latour X., Laguerre G., Boeufgras J., Alabouvette C. 1995. Effect of 2 plant-species, flax (*Linum usitatissimum* L.) and tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill), on the diversity of soilborne populations of fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1004-1012.

110. Liu R., Jadeja R.N., Zhou Q., Liu Z. 2012. Treatment and remediation of petroleum-contaminated soils using selective ornamental plants. *Environ. Eng. Sci.* 29, 494–501.
111. Logeshwaran P., Megharaj M., Chadalavada S., Bowman M., Naidu R. 2018. Petroleum hydrocarbons (PH) in groundwater aquifers: An overview of environmental fate, toxicity, microbial degradation and risk-based remediation approaches. *Environ. Technol. Innovation* doi 10.1016/j.eti.2018.02.001.
112. Lorck H. 1948. Production of hydrocyanic acid by bacteria. *Physiol. Plantarum* 1, 142–146.
113. Lozupone C.A., Knight R. 2007. Global patterns in bacterial diversity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 11436–11440.
114. Lumactud R., Shen S.Y., Lau M., Fulthorpe R. 2016. Bacterial endophytes isolated from plants in natural oil seep soils with chronic hydrocarbon contamination. *Front. Microbiol.* 7, 755.
115. Łyszcz M., Gałązka A. 2016. Wybrane metody molekularne wykorzystywane w ocenie bioróżnorodności mikroorganizmów glebowych. *Post. Mikrobiol.* 55, 309–319.
116. Ma B., Lv X., Warren A., Gong J. 2013. Shifts in diversity and community structure of endophytic bacteria and archaea across root, stem and leaf tissues in the common reed, *Phragmites australis*, along a salinity gradient in a marine tidal wetland of northern China. *Antonie Van Leeuwenhoek* 104, 759–768.
117. Ma Y., Oliveira R.S., Freitas H., Zhang C. 2016. Biochemical and molecular mechanisms of plant-microbe-metal interactions: relevance for phytoremediation. *Front. Plant Sci.* 7, 918.
118. Małachowska-Jutysz A., Janosz W., Rudek J. 2012. Toksyczność gleby zanieczyszczonej olejem silnikowym poddanej samooczyszczaniu oraz fitoremediacji. *Ochrona Środowiska* 34, 15–20.
119. Maliszewska-Kordybach B., Smreczak B., Klimkowicz-Pawlas A., Terelak H. 2008. Monitoring of the total content of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in arable soils in Poland. *Chemosphere* 73, 1284–1291.
120. Marecik R., Króliczak P., Cyplik P. 2006. Fitoremediacja—alternatywa dla tradycyjnych metod oczyszczania środowiska. *Biotechnologia* 3, 88–97.
121. Maropola M.K., Ramond J.B., Trindade M. 2015. Impact of metagenomic DNA extraction procedures on the identifiable endophytic bacterial diversity in *Sorghum bicolor* (L. Moench). *J. Microbiol. Methods* 112, 104–117.

122. Martinez-Garcia P.M., Ruano-Rosa D., Schilirò E., Prieto P., Ramos C., Rodríguez-Palenzuela P., Mercado-Blanco J. 2015. Complete genome sequence of *Pseudomonas fluorescens* strain PICF7, an indigenous root endophyte from olive (*Olea europaea* L.) and effective biocontrol agent against *Verticillium dahlia*. Stand. Genomic Sci. 10, 10.
123. Mayak S., Tirosh T., Glick B.R. 2004. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomato and pepper. Plant Sci. 166, 525–530.
124. McGuinness M., Dowling D. 2009. Plant-associated bacterial degradation of toxic organic compounds in soil. Int. J. Env. Res. Publ. Hlth. 6, 2226–2247.
125. Mercado-Blanco J., Lugtenberg B.J.J. 2014. Biotechnological applications of bacterial endophytes. Curr. Biotechnol. 3, 60–75.
126. Mrozik A., Piotrowska-Seget Z., Łabużek S. 2003. Bacterial degradation and bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Pol. J. Environ. Stud. 12, 15–25.
127. Mrozik A., Piotrowska-Seget Z., Łabużek S. 2005. Bacteria in bioremediation of hydrocarbon-contaminated environments. Post. Mikrobiol. 44, 227–238.
128. Mueller K.E., Shann J.R. 2006. PAH dissipation in spiked soil: impacts of bioavailability, microbial activity, and trees. Chemosphere 64, 1006–1014.
129. Muller H., Berg C., Landa B.B., Auerbach A., Moissl-Eichinger C., Berg G. 2015. Plant genotype-specific archaeal and bacterial endophytes but similar *Bacillus antagonists* colonize Mediterranean olive trees. Front.Microbiol. 6, 138.
130. Murinowa S., Dercova K. 2014. Response mechanisms of bacterial degraders to environmental contaminants on the level of cell walls and cytoplasmic membrane. Int. J. Microbiol. 873081, doi 10.1155/2014/873081.
131. Naveed M., Mitter B., Yousaf S., Pastar M., Afzal M., Sessitsch A. 2014. The endophyte *Enterobacter* sp. FD17: a maize growth enhancer selected based on rigorous testing of plant beneficial traits and colonization characteristics. Biol. Fertil. Soils 50, 249–262.
132. Nie Y., Chi Ch.Q., Fang H., Liang J.L., Lu S.L., Lai G.L., Tang Y.Q., Wu X.L. 2014. Diverse alkane hydroxylase genes in microorganisms and environments. Sci. Rep. 4, 4968.
133. Nyssonen M. 2009. Functional genes and gene array analysis as tools for monitoring hydrocarbon biodegradation. VTT Publications 711.
134. Okunishi S., Sako K., Mano H., Imamura A., Morisaki H. 2005. Bacterial flora of endophytes in the maturing seed of cultivated rice (*Oryza sativa*). Microbes Environ. 20, 168–177.

135. Oliveira A.L.M., de Lima Canuto E., Reis V.M., Baldani J.I. 2003. Response of micropropagated sugarcane varieties to inoculation with endophytic diazotrophic bacteria. *Braz. J. Microbiol.* 34, 59–61.
136. Oliveira M.N., Santos T.M., Vale H.M., Delvaux J.C., Cordero A.P., Ferreira A.B., Miguel P.S., Tótola M.R., Costa M.D., Moraes C.A., Borges A.C. 2013. Endophytic microbial diversity in coffee cherries of *Coffea arabica* from southeastern Brazil. *Can. J. Microbiol.* 59, 221–230.
137. Oliveira V., Gomes N.C.M., Almeida A., Silva A.M.S., Simões M.M.Q., Smalla K., Cunha Â. 2014. Hydrocarbon contamination and plant species determine the phylogenetic and functional diversity of endophytic degrading bacteria. *Mol. Ecol.* 23, 1392–1404.
138. Pacwa-Płociniczak M., Płaza G.A., Piotrowska-Seget Z., Cameotra S.S. 2011. Environmental applications of biosurfactants: recent advances. *Int. J. Mol. Sci.* 18, 633–654.
139. Pacwa-Płociniczak M., Płaza G.A., Poliwoda A., Piotrowska-Seget Z. 2014. Characterization of hydrocarbon-degrading and biosurfactant-producing *Pseudomonas* sp. P-1 strain as a potential tool for bioremediation of petroleum-contaminated soil. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 21, 9385–9395.
140. Palaniappan P., Chauhan P.S., Saravanan V.S., Anandham R., Sa T. 2010. Isolation and characterization of plant growth promoting endophytic bacterial isolates from root nodule of *Lespedeza* sp. *Biol. Fertil. Soils* 46, 807–816.
141. Pandya M., Rajput M., Rajkumar S. 2015. Exploring plant growth promoting potential of non rhizobial root nodules endophytes of *Vigna radiate*. *Microbiology* 84, 80–89.
142. Parthipan P., Preetham E., Machuca L.L., Rahman P.K.S.M., Murugan K., Rajasekar A. 2017. Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium *Bacillus subtilis* A1. *Front. Microbiol.* 8, doi 10.3389/fmicb.2017.00193.
143. Paskova V., Hilscherová K., Feldmannová M., Bláha L. 2006. Toxic effects and oxidative stress in higher plants exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons and their N-heterocyclic derivatives. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 3238–3245.
144. Pawlik M., Cania B., Thijs S., Vangronsveld J. 2017. Hydrocarbon degradation potential and plant growth-promoting activity of culturable endophytic bacteria of *Lotus corniculatus* and *Oenothera biennis* from a long-term polluted site. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 19640–19652.



145. Pawlik M., Piotrowska-Seget Z. 2015. Endophytic bacteria associated with *Hieracium piloselloides*: their potential for hydrocarbon-utilizing and plant growth-promotion. J. Toxicol. Env. Heal. A 78, 860-870.
146. Pawlik M., Płociniczak T., Piotrowska-Seget Z. 2015. Bakterie endofityczne i ich znaczenie w mikrobiologii środowiskowej, medycynie i przemyśle. Post. Mikrobiol. 54, 115–122.
147. Peng A., Liu J., Gao Y., Chen Z. 2013. Distribution of endophytic bacteria in *Alopecurus aequalis* Sobol and *Oxalis corniculata* L. from soils contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons. PLoS ONE 8, 12.
148. Peng S., Zhou Q., Cai Z., Zhang Z. 2009. Phytoremediation of petroleum contaminated soils by *Mirabilis Jalapa* L. in a greenhouse plot experiment. J. Hazard. Mater. 168, 1490-1496.
149. Pereira S.I.A., Monteiro C., Vega A.L., Castro P.M.L. 2016. Endophytic culturable bacteria colonizing *Lavandula dentata* L. plants: Isolation, characterization and evaluation of their plant growth-promoting activities. Ecol. Eng. 87, 91–97.
150. Phillips L.A., Germida J.J., Farrell R.E., Greer C.W. 2008. Hydrocarbon degradation potential and activity of endophytic bacteria associated with prairie plants. Soil Biol. Biochem. 12, 3054-3064.
151. Pikovskaya R.I. 1948. Mobilization of phosphorus in soil connection with vital capacity of source microbial species. Microbiologiya 17, 362-370.
152. Piński A., Hupert-Kocurek K. 2016. Genetyczne podłoże oddziaływań bakterii endofitycznych z roślinami. Post. Mikrobiol. 55, 404-412.
153. Pisarska K., Pietr S.J. 2014. Bakterie endofityczne–ich pochodzenie i interakcje z roślinami. Post. Mikrobiol. 53, 141-151.
154. PN-EN ISO 16703. Jakość gleby-Oznaczenie zawartości węglowodorów w zakresie od C10 do C40 metodą chromatografii gazowej.
155. Pointing S.B. 1999. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. Fungal Divers. 2, 17–33.
156. Porteous-Moore F.P., Barac T., Borremans B., Oeyen L., Vangronsveld J., van der Lelie D., Campbell C.D., Moore E.R. 2006. Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: the characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation. Syst. Appl. Microbiol. 7, 539-556.

157. Powell S.M., Ferguson S.H., Bowman J.P., Snape I. 2006. Using real-time PCR to assess changes in the hydrocarbon-degrading microbial community in Antarctic soil during bioremediation. *Microbiol. Ecol.* 52, 523–532.
158. Preston G.M. 2004. Plant perceptions of plant growth-promoting *Pseudomonas*. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 359, 907–918.
159. Qin S., Miao Q., Feng W.W., Wang Y., Zhu X., Xing K., Jiang J.H. 2015. Biodiversity and plant growth promoting traits of culturable endophytic actinobacteria associated with *Jatropha curcas* L. growing in Panxi dry-hot valley soil. *Appl. Soil Ecol.* 93, 47–55.
160. Quince C., Lanzén A., Curtis T.P., Davenport R.J., Hall N., Head I.M., Read L.F., Sloan W.T. 2009. Accurate determination of microbial diversity from 454 pyrosequencing data. *Nat. Methods* 6, 639–641.
161. Raaijmakers J.M., de Bruijn I., de Kock M.J.D. 2006. Cyclic lipopeptide production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: diversity, activity, biosynthesis, and regulation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19, 699–710.
162. Rajendran G., Sing F., Desai A.J., Archana G. 2008. Enhanced growth and nodulation of pigeon pea by co-inoculation of *Bacillus* strains with *Rhizobium* spp. *Bioresour. Technol.* 99, 4544–4550.
163. Rakowska J., Radwan K., Śłosorz Z., Pietraszek E., Łudzik M., Suchorab P. 2012. Usuwanie substancji ropopochodnych z dróg i gruntów. Centrum naukowo-badawcze ochrony przeciwpożarowej im. Józefa Tuliszkowskiego. Państwowy Instytut Badawczy, Józefów.
164. Rasche F., Lueders T., Schlöter M., Schaefer S., Buegger F., Gättinger A., Hood-Nowotny R.C., Sessitsch A. 2009. DNA-based stable isotope probing enables the identification of active bacterial endophytes in potatoes. *New Phytologist*. 181, 802e807.
165. Reinhold-Hurek B., Hurek T. 2011. Living inside plants: bacterial endophytes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 435–443.
166. Reinhold-Hurek B., Hurek T. 1998. Interactions of gramineous plants with *Azoarcus* spp. and other diazotrophs: identification, localization, and perspectives to study their function. *Crit. Rev. Plant Sci.* 17, 29–54.
167. Reinhold-Hurek B., Maes T., Gemmer S., van Montagu M., Hurek T. 2006. An endoglucanase is involved in infection of rice roots by the not-cellulose-metabolizing endophyte *Azoarcus* sp. strain BH72. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 181–188.

168. Romero F.M., Marina M., Pieckenstain F.L. 2014. The communities of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) leaf endophytic bacteria, analyzed by 16S-ribosomal RNA gene pyrosequencing. *FEMS Microbiol. Lett.* 351, 187-94.
169. Rosenblueth M., López-López A., Martínez J., Rogel M.A., Toledo I., Martínez-Romero I. 2010. Seed bacterial endophytes: common genera, seed-to-seed variability and their possible role in plants. *Acta Hort* 938, 39–48.
170. Rosenblueth M., Martínez-Romero E. 2006: Bacterial endophytes and their interaction with host. *Mol. Plant-Microbe Inter.* 19, 827–837.
171. Rudrappa T., Czymmek K.J., Pare P.W., Bais H.P. 2008. Root-secreted malic acid recruits beneficial soil bacteria. *Plant Physiol.* 148, 1547–1556.
172. Rusin M., Gospodarek J., Nadgórska-Socha A. 2015. The effect of petroleum-derived substances on the growth and chemical composition of *Vicia faba* L. *Pol. J. Environ. Stud.* 24, 2157-2166.
173. Ryan R.P., Germaine K., Franks A., Ryan D.J., Dowling D.N. 2008. Bacterial endophytes: Recent developments and applications. *FEMS Microbiol. Lett.* 278, 1-9.
174. Sadrnia M., Maksimava N., Khromsova E., Stanislavitch S., Owlia P., Marjomandzadegan M. 2011. Study the effect of bacterial 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase (ACC deaminase) on resistance to salt stress in tomato plant. *Fascicula Biologie* 2, 120–123.
175. Saleem H. 2016. Plant-bacteria partnership: phytoremediation of hydrocarbons contaminated soil and expression of catabolic genes. *Bulletin of Environmental Studies* 1, 18-28.
176. Sanchez-Lopez A.S., Thijs S., Beckers B., González-Chávez M.C., Weyens N., Carrillo-González R., Vangronsveld J. 2017. Community structure and diversity of endophytic bacteria in seeds of three consecutive generations of *Crotalaria pumila* growing on metal mine residues. *Plant Soil*, doi 10.1007/s11104-017-3176-2.
177. Sanderman H. 1992. Plant metabolism of xenobiotics. *TIBS* 17, 82–84.
178. Santoyo G., Moreno-Hagelsieb G., Orozco-Mosqueda M.O., Glick B.R. 2016. Plant growth-promoting bacterial endophytes. *Microbiol. Res.* 183, 92–99.
179. Schwyn B., Neilands J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal. Biochem.* 160, 47-56.
180. Seghers D., Wittebolle L., Top E.M., Verstraete W., Siciliano S.D. 2004. Impact of agricultural practices on the *Zea mays* L. endophytic community. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 1475–1482.

181. Sen M.K., Jamal M.A.H.M., Nasrin S. 2013. Sterilization factors affect seed germination and proliferation of *Achyranthes aspera* cultured *in vitro*. Environ. Exper. Biol. 11, 119–123.
182. Seo J.S., Keum Y.S., Li Q.X. 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds. Int. J. Environ. Res. Public Health. 6, 278-309.
183. Sessitsch A., Coenye T., Sturz A.V., Vandamme P., AitBarka E., Salles J.F., van Elsas J.D., Faure D., Reiter B., Glick B.R., Wang-Pruski G., Nowak J. 2005. *Burkholderia phytofirmans* sp. nov., a novel plant-associated bacterium with plant-beneficial properties. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 1187–1192.
184. Sessitsch A., Hardoim P., Döring J., Weilharter A., Krause A., Woyke T., Mitter B., Hauberg-Lotte L., Friedrich F., Rahalkar M., Hurek T., Sarkar A., Bodrossy L., van Overbeek L., Brar D., van Elsas J.D., Reinhold-Hurek B. 2012. Functional characteristics of an endophyte community colonizing rice roots as revealed by metagenomic analysis. Mol. Plant Microbe Interact. 25, 28-36.
185. Sessitsch A., Kuffner M., Kidd P., Vangronsveld J., Wenzel W., Fallmann K., Puschenreiter M. 2013. The role of plant-associated bacteria in the mobilization and phytoextraction of trace elements in contaminated soils. Soil Biol. Biochem. 60, 182-194.
186. Sgroy V., Cassán F., Masciarelli O., Florencia M., Papa D., Lagares A., Luna V. 2009. Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 85, 371–381.
187. Shi Y., Lou K., Li Ch. 2009. Promotion of plant growth by phytohormone-producing endophytic microbes of sugar beet. Biol. Fertil. Soils 45, 645–653.
188. Shi Y., Yang H., Zhang T., Sun J., Lou K. 2014. Illumina-based analysis of endophytic bacterial diversity and space-time dynamics in sugar beet on the north slope of Tianshan mountain. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98, 6375-6385.
189. Shi Y., TaPa M., Li C., Yang H., Zhang T., Gao Y., Sun J., Zeng J., Lin Q., Cao Z., OuTi K., Li Y., Lou K. 2015. Diversity and space-time dynamics of endophytic archaea from sugar beet in the north slope of Tianshan Mountain revealed by 454 pyrosequencing and T-RFLP. World J. Microbiol. Biotechnol. 31, 1031-1039.
190. Shirdam R., Zand A., Bidhendi G., Mehrdadi N. 2008. Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils with emphasis on the effect of petroleum hydrocarbons on the growth of plant species. Phytoprotection 89, 21–29.

191. Siciliano S.D., Fortin N., Mihoc A., Wisse G., Labelle S., Beaumier D., Ouellette D., Roy R., Whyte L.G., Banks M.K., Schwab P., Lee K., Greer C.W. 2001. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 6, 2469-2475.
192. Sikkema J., de Bont J.A., Poolman B. 1995. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev.* 59, 201-222.
193. Soleimani M., Afyuni M., Hajabbasi A.M., Nourbakhsh F., Sabzalilian M.R., Christensen J.H. 2010. Phytoremediation of aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses. *Chemosphere* 81, 1084–1090.
194. Souza R., Ambrosini A., Passaglia L.M.P. 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet. Mol. Biol.* 38, 401-419.
195. Souza S.A., Xavier A.A., Costa M.R., Cardoso A.M., Pereira M.C., Nietsche S. 2013. Endophytic bacterial diversity in banana 'Prata Anã' (*Musa* spp.) roots. *Genet. Mol. Biol.* 36, 252-64.
196. Spaepen S., Vanderleyden J. 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a001438.
197. Steliga T. 2014. Ocena efektywności biodegradacji węglowodorów ropopochodnych w zastarzałym odpadzie z dołu urobkowego Graby-59 w warunkach przemysłowych metodą in-situ. *Nafta-Gaz* 6, 351-364.
198. Stępniewska Z., Kuźniar A. 2013. Endophytic microorganisms—promising applications in bioremediation of greenhouse gases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 9589–9596.
199. Stolz A. 2009. Molecular characteristics of xenobiotic-degrading sphingomonads. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 793–811.
200. Su J., Ouyang W., Hong Y., Liao D., Khan S., Li H. 2016. Responses of endophytic and rhizospheric bacterial communities of salt marsh plant (*Spartina alterniflora*) to polycyclic aromatic hydrocarbons contamination. *J. Soils Sediments* 16, 707-715.
201. Subramanian P., Kim K., Krishnamoorthy R., Sundaram S., Sa T. 2015. Endophytic bacteria improve nodule function and plant nitrogen in soybean on co-inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* MN110. *Plant Growth Regul.* 76, 327-332.
202. Sun K., Liu J., Jin L., Gao Y. 2014. Utilizing pyrene-degrading endophytic bacteria to reduce the risk of plant pyrene contamination. *Plant Soil* 374, 251-262.

203. Sun L., Qiu F., Zhang X., Dai X., Dong X., Song W. 2008. Endophytic bacterial diversity in rice (*Oryza sativa* L.) roots estimated by 16S rDNA sequence analysis. *Microb. Ecol.* 55, 415–424.
204. Sun Y., Cheng Z., Glick B.R. 2009. The presence of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase deletion mutational alters the physiology of the endophytic plant growth-promoting bacterium *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *FEMS Microbiol. Lett.* 296, 131–136.
205. Taghavi S., Garafola C., Monchy S., Newman L., Hoffman A., Weyens N., Barac T., Vangronsveld J., van der Lelie D. 2009. Genome survey and characterization of endophytic bacteria exhibiting a beneficial effect on growth and development of poplar trees. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 748–757.
206. Taghavi S., van der Lelie D., Hoffman A., Zhang Y.B., Walla M.D., Vangronsveld J., Newman L., Monchy S. 2010. Genome sequence of the plant growth promoting endophytic bacterium *Enterobacter* sp. 638. *Plos Genetics* 6, e1000943.
207. Tang J., Wang R., Niu X., Zhou Q. 2010. Enhancement of soil petroleum remediation by using a combination of ryegrass (*Lolium perenne*) and different microorganisms. *Soil Till. Res.* 110, 87–93.
208. Tardif S., Yergeau É., Tremblay J., Legendre P., Whyte L.G., Greer C.W. 2016. The willow microbiome is influenced by soil petroleum hydrocarbon concentration with plant compartment-specific effects. *Front. Microbiol.* 7, 1363.
209. Thapa B., Kumar A.K.C., Ghimire A. 2012. A review on bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. *Kathmandu University Journal Of Science, Engineering And Technology* 8, 164–170.
210. Thijs S., van Dillewijn P., Sillen W., Truyens S., Holtappels M., D'Haen J., Carleer R., Weyens N., Ameloot M., Ramos J.L., Vangronsveld J. 2014. Exploring the rhizospheric and endophytic bacterial communities of *Acer pseudoplatanus* growing on a TNT-contaminated soil: towards the development of a rhizocompetent TNT-detoxifying plant growth promoting consortium. *Plant Soil* 385, 15–36.
211. Tran P.N., Tan N.E.H., Lee Y.P., Gan H.M., Polter S.J., Dailey L.K., Hudson A.O., Savka M.A. 2015. Whole-genome sequence and classification of 11 endophytic bacteria from poison ivy (*Toxicodendron radicans*). *Genome Announc.* 3, e01319–15.
212. Truyens S., Beckers B., Thijs S., Weyens N., Cuypers A., Vangronsveld J. 2016. Cadmium-induced and transgenerational changes in the cultivable and total seed endophytic community of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol.* 18, 376–381.

213. Truyens S., Weyens N., Cuypers A., Vangronsveld J. 2015. Bacterial seed endophytes: genera, vertical transmission and interaction with plants. *Environ. Microbiol. Rep.* 7, 40-50.
214. Tsurumaru H., Okubo T., Okazaki K., Hashimoto M., Kakizaki K., Hanzawa E., Takahashi H., Asanome N., Tanaka F., Sekiyama Y., Ikeda S., Minamisawa K. 2015. Metagenomic analysis of the bacterial community associated with the taproot of sugar beet. *Microbes Environ.* 30, 63–69.
215. Ujowundu C.O., Kalu F.N., Nwaoguikpe R.N., Kalu O.I., Ihejirika C.E., Nwosunjoku E.C., Okechukwu R.I. 2011. Biochemical and physical characterization of diesel petroleum contaminated soil in southeastern Nigeria. *Res. J. Chem. Sci.* 1, 57-62.
216. Ukalska-Jaruga A., Smreczak B., Klimkowicz-Pawlas A., Maliszewska-Kordybach B. 2015. Rola materii organicznej w procesach akumulacji trwałych zanieczyszczeń organicznych (TZO) w glebach. *Polish Journal of Agronomy* 20, 15–23.
217. van Beilen J.B., Funhoff E.G., van Loon A., Just A., Kaysser L., Bouza M., Holtackers R., Rothlisberger M., Li Z., Witholt B. 2006. Cytochrome P450 alkane hydroxylases of the CYP153 family are common in alkane-degrading eubacteria lacking integral membrane alkane hydroxylases. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 59–65.
218. van Bogaert I.N.A., Groeneboer S., Saerens K., Soetaert W. 2011. The role of cytochrome P450 monooxygenases in microbial fatty acid metabolism. *FEBS J.* 278, 206–221.
219. van Epps A. 2006. Environmental protection agency office of solid waste and emergency response office of superfund remediation and technology innovation. Washington.
220. van Overbeek L., van Elsas J.D. 2008. Effects of plant genotype and growth stage on the structure of bacterial communities associated with potato (*Solanum tuberosum* L.). *FEMS Microbiol. Ecol.* 64, 283-296.
221. Vangronsveld J., Herzig R., Weyens N., Boulet J., Adriaensen K., Ruttens A., Thewys T., Vassilev A., Meers E., Nehnevajova E., van der Lelie D., Mench M. 2009. Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 16, 765–794.
222. Vargas L., Santa Brígida A.B., Mota Filho J.P., de Carvalho T.G., Rojas C.A., Vaneechoutte D., van Bel M., Farrinelli L., Ferreira P.C.G., Vandepoele K., Hermely A.S. 2014. Drought tolerance conferred to sugarcane by association with

- Gluconacetobacter diazotrophicus*: a transcriptomic view of hormone pathways. PLoS ONE 9, e114744.
223. Velho R.V., Medina L.F.C., Segalin J., Brandelli A. 2011. Production of lipopeptides among *Bacillus* strains showing growth inhibition of phytopathogenic fungi. Folia Microbiol. 56, 297–303.
224. Verma S.C., Ladha J.K., Tripathi A.K. 2001. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. J. Biotechnol. 91, 127–141.
225. Verma V.C., Singh S.K., Prakash S. 2011. Bio-control and plant growth promotion potential of siderophore producing endophytic *Streptomyces* from *Azadirachta indica* A. Juss. J. Basic Microbiol. 51, 550–556.
226. Wagner M.R., Lundberg D.S., Rio T.G., Tringe S.G., Dangel J.L., Olds T.M. 2016. Host genotype and age shape the leaf and root microbiomes of a wild perennial plant. Nat. Commun. 7, 12151.
227. Wang D., Xie Y., Jaisi D.P., Jin Y. 2016a. Effects of low-molecular-weight organic acids on the dissolution of hydroxyapatite nanoparticles. Environ. Sci. Nano. 3, 768–779.
228. Wang M., Yang P., Falcão Salles J. 2016b. Distribution of root-associated bacterial communities along a salt-marsh primary succession. Front. Plant Sci. 6, 1188.
229. Wang Y., Li H., Zhao W., He X., Chen J., Geng X., Xiao M. 2010. Induction of toluene degradation and growth promotion in corn and wheat by horizontal gene transfer within endophytic bacteria. Soil Biol. Biochem. 42, 1051–1057.
230. Wemheuer F., Kaiser K., Karlovsky P., Daniel R., Vidal S., Wemheuer B. 2017. Bacterial endophyte communities of three agricultural important grass species differ in their response towards management regimes. Sci. Rep. 7, 40914.
231. Weyens N., Taghavi S., Barac T., van der Lelie D., Boulet J., Artois T., Carleer R., Vangronsveld J. 2009a. Bacteria associated with Oak and Ash on a TCE-contaminated site: characterization of isolates with potential to avoid evapotranspiration. Environ. Sci. Pollut. Res. 16, 830–843.
232. Weyens N., van der Lelie D., Artois T., Smeets K., Taghavi S., Newman L., Carleer R., Vangronsveld J. 2009b. Bioaugmentation with engineered endophytic bacteria improves phytoremediation. Environ. Sci. Technol. 43, 9413–9418.



233. Weyens N., van der Lelie D., Taghavi S., Newman L., Vangronsveld J. 2009c. Exploiting plant-microbe partnerships for improving biomass production and remediation. *Trends Biotechnol.* 27, 591-598.
234. Weyens N., van der Lelie D., Taghavi S., Vangronsveld J. 2009d. Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2, 248-254.
235. Wu X., Monchy S., Taghavi S., Zhu W., Ramos J., van der Lelie D. 2010. Comparative genomics and functional analysis of niche-specific adaptation in *Pseudomonas putida*. *FEMS Microbiol. Rev.* 35, 299-323.
236. Xu J.Y., Han Y.H., Chen Y., Zhu L.J., Ma L.Q. 2016. Arsenic transformation and plant growth promotion characteristics of As-resistant endophytic bacteria from As-hyperaccumulator *Pteris vittata*. *Chemosphere* 144, 1233-1240.
237. Xu Y., Sun G.D., Jin J.H., Liu Y., Luo M., Zhong Z.P., Liu Z.P. 2014. Successful bioremediation of an aged and heavily contaminated soil using a microbial/plant combination strategy. *J. Hazard. Mater.* 264, 430-438.
238. Yang P., Sun Z., Liu S., Lu H., Zhou Y., Sun M. 2013. Combining antagonistic endophytic bacteria in different growth stages of cotton for control of *Verticillium wilt*. *Crop Prot.* 47, 17-23.
239. Ying X., Dongmei G., Judong L., Zhenyu W. 2011. Plant-microbe interactions to improve crude oil degradation. *Energy Procedia* 5, 844-848.
240. Yousaf S., Afzal M., Reichenauer T.G., Brady C.L., Sessitsch A. 2011. Hydrocarbon degradation, plant colonization and gene expression of alkane degradation genes by endophytic *Enterobacter ludwigii* strains. *Environ. Pollut.* 10, 2675-2683.
241. Yousaf S., Andria V., Reichenauer T.G., Smalla K., Sessitsch A. 2010a. Phylogenetic and functional diversity of alkane degrading bacteria associated with Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) and Birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) in a petroleum oil-contaminated environment. *J. Hazard. Mater.* 1-3, 523-532.
242. Yousaf S., Ripka K., Reichenauer T.G., Andria V., Afzal M., Sessitsch A. 2010b. Hydrocarbon degradation and plant colonization by selected bacterial strains isolated from Italian ryegrass and birdsfoot trefoil. *J. Appl. Microbiol.* 4, 1389-1401.
243. Yuan J., Zhang N., Huang Q., Raza W., Li R., Vivanco J.M., Shen Q. 2015. Organic acids from root exudates of banana help root colonization of PGPR strain *Bacillus amyloliquefaciens* NJN-6. *Sci. Rep.* 5, 13438.

- 
244. Zampolli J., Collina E., Lasagni M., Gennaro P. 2014. Biodegradation of variable-chain-length *n*-alkanes in *Rhodococcus opacus* R7 and the involvement of an alkane hydroxylase system in the metabolism. *AMB Express* 4, 1-9.
245. Zgadzaj R., James E.K., Kelly S., Kawaharada Y., de Jonge N., Jensen D.B., Madsen L.H., Radutoiu S. 2015. A legume genetic framework controls infection of nodules by symbiotic and endophytic bacteria. *PLoS Genet* 11, e1005280.
246. Zhang Z.B., Deng H., Wang H., Yin R., Hallett P.D., Griffiths B.S., Daniell T.J. 2010. Does microbial habitat or community structure drive the functional stability of microbes to stresses following re-vegetation of a severely degraded soil? *Soil Biol. Biochem.* 42, 850–859.
247. Ziółkowska A., Wyszowski M. 2010. Toxicity of petroleum substances to microorganisms and plants. *Ecol. Chem. Eng. S* 17, 73-82.
248. Zúñiga A., Poupin M.J., Donoso R., Ledger T., Guiliani N., Gutiérrez R.A., González B. 2013. Quorum sensing and indole-3-acetic acid degradation play a role in colonization and plant growth promotion of *Arabidopsis thaliana* by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. *Mol. Plant Microbe Interact.* 26, 546–553.